

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

**MEIOS DE CULTIVO E SISTEMAS DE
MICROPROPAGAÇÃO NO CRESCIMENTO *IN VITRO* E
ESTABELECIMENTO *EX VITRO* DE ORQUÍDEAS
NATIVAS DO CERRADO**

GEISIANNY PEREIRA NUNES

**DOURADOS
MATO GROSSO DO SUL
2021**

**MEIOS DE CULTIVO E SISTEMAS DE MICROPROPAGAÇÃO
NO CRESCIMENTO *IN VITRO* E ESTABELECIMENTO *EX VITRO*
DE ORQUÍDEAS NATIVAS DO CERRADO**

GEISIANNY PEREIRA NUNES
Biotecnologista

Orientador: PROF. DR. JOSÉ CARLOS SORGATO

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia - Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre.

Dourados
Mato Grosso do Sul
2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

N972m Nunes, Geisianny Pereira

Meios de cultivo e sistemas de micropropagação no crescimento in vitro e estabelecimento ex vitro de orquídeas nativas do Cerrado [recurso eletrônico] / Geisianny Pereira Nunes. -- 2021.
Arquivo em formato pdf.

Orientador: José Carlos Sorgato.

Dissertação (Mestrado em Agronomia)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2021.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:

<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Orchidaceae. 2. Biorreator. 3. Produção. I. Sorgato, José Carlos. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

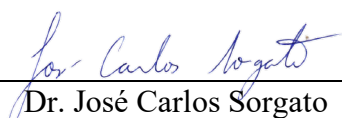
**MEIOS DE CULTIVO E SISTEMAS DE MICROPROPAGAÇÃO NO
CRESCIMENTO *IN VITRO* E ESTABELECIMENTO *EX VITRO* DE
ORQUÍDEAS NATIVAS DO CERRADO**

por

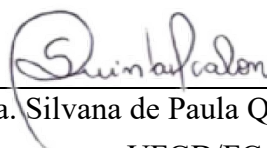
Geisianny Pereira Nunes

Dissertação apresentada como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de
MESTRE EM AGRONOMIA

Aprovada em: 27 de agosto de 2021



Dr. José Carlos Sorgato
Orientador – UFGD/FCA



Dra. Silvana de Paula Quintão Scalon
UFGD/FCA



Dr. Rodrigo Kelson Silva Rezende
UFGD/FCA



Dra. Jackeline Schultz Soares
UFGD/FCA

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder saúde, sabedoria e coragem para superar todos os desafios.

Aos meus pais Lisnei Pereira de Camargo e Ramão Duarte Nunes, e a minha irmã Geisielly Pereira Nunes, pelo incentivo, apoio e por sempre acreditarem em mim. Sem vocês, nada seria possível. Amo vocês!

Ao meu orientador, Dr. José Carlos Sorgato, por todo conhecimento transmitido, paciência e por seu exemplo de profissionalismo. Obrigada pelo apoio durante a realização deste trabalho e pela confiança em mim depositada.

Ao professor Dr. Rodrigo Kelson Silva Rezende, pelos ensinamentos, amizade e por ceder o laboratório para a realização do projeto.

Aos técnicos de laboratório Dra. Jackeline Schultz Soares e Ederson Marcelo Klein, pelo auxílio durante a pesquisa, ensinamentos, amizade e dedicação.

À Universidade Federal da Grande Dourados pela disponibilidade da estrutura necessária para execução do projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela bolsa concedida durante o período da realização deste trabalho e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal da Grande Dourados, pela oportunidade de realização do curso.

A todos os colegas do GEHORTI pela amizade e por estarem sempre dispostos a ajudar, em especial a Jéssica Celeste Mônico Ramos e ao Luan Marlon Ribeiro.

Aos meus amigos Claudia Alessandra Castanharo, Endy Willians, Luiz Guilherme Vieira de Carvalho e Mateus Batista Santana, pelos conselhos, carinho, paciência e incentivo. Obrigada pelo companheirismo, por todos os momentos felizes compartilhados e também pelo apoio nos momentos difíceis. Vocês foram fundamentais, obrigada por tudo.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a concretização deste trabalho, meu muito obrigada.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| RESUMO | v |
| ABSTRACT..... | vi |
| INTRODUÇÃO GERAL | 1 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 7 |
| | |
| CAPÍTULO I - MEIOS ALTERNATIVOS NO CRESCIMENTO <i>IN VITRO</i> E ACLI MATI Z A Ç Ã O D E O R Q U Í D E A S N A T I V A S D O C E R R A D O..... | 12 |
| RESUMO | 12 |
| ABSTRACT..... | 13 |
| 1. INTRODUÇÃO | 14 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS | 16 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 20 |
| 4. CONCLUSÃO | 30 |
| 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 31 |
| | |
| CAPÍTULO II - SISTEMAS DE MICROPROPAGAÇÃO E ACLI MATI Z A Ç Ã O D E <i>Cattleya nobilior</i> Rchb.f..... | 34 |
| RESUMO | 34 |
| ABSTRACT..... | 35 |
| 1. INTRODUÇÃO | 36 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS | 38 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 41 |
| 4. CONCLUSÃO | 50 |
| 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 51 |

MEIOS DE CULTIVO E SISTEMAS DE MICROPROPAGAÇÃO NO CRESCIMENTO *IN VITRO* E ESTABELECIMENTO *EX VITRO* DE ORQUÍDEAS NATIVAS DO CERRADO

RESUMO GERAL

A família Orchidaceae possui grande representatividade no Cerrado brasileiro, no entanto, a beleza e diversidade de suas flores faz com que algumas espécies sofram coleta predatória. Uma forma de diminuir a vulnerabilidade dessas orquídeas devido ao extrativismo é a produção comercial. Assim, objetivou-se avaliar a produção e conservação de três espécies nativas do Cerrado, por meio de técnicas de cultivo *in vitro*. Para atingir o objetivo proposto foram realizados dois experimentos independentes: 1- objetivou-se avaliar o crescimento *in vitro* e o estabelecimento *ex vitro* de *Cattleya nobilior* Rchb.f., *Cattleya walkeriana* Gardner e *Schomburgkia crispa* Lindl. cultivadas por diferentes sistemas de sistema de cultivo *in vitro* mixotrófico que permite trocas gasosas, utilizando meios de cultivo suplementados com diferentes materiais orgânicos (1- MS; 2- MS + polpa de banana (PB); 3- MS + água de coco (AC); 4- MS + farinha de banana (FB); 5- MS + PB + AC ou 6- MS + FB + AC). Para *C. nobilior*, o meio MS combinado com polpa de banana e água de coco proporcionou o maior crescimento *in vitro* e estabelecimento *ex vitro* das plantas. Para *C. walkeriana*, o cultivo em meio MS suplementado com água de coco foi favorável para o crescimento *in vitro* e aclimatização das mudas. Para *S. crispa*, o meio de cultivo que favoreceu tanto o crescimento *in vitro* quanto a aclimatização das plantas foi o MS suplementado com polpa de banana. 2- objetivou-se avaliar o crescimento *in vitro* e o estabelecimento *ex vitro* de plantas de *C. nobilior* cultivadas em diferentes sistemas de micropropagação (1- sistema convencional (SC) ou 2- biorreator de imersão temporária (BIT)) e meios de cultivo (1- MS; 2- MS + polpa de banana (PB); 3- MS + água de coco (AC) ou 4- MS + PB + AC). O cultivo em biorreator de imersão temporária utilizando meio MS suplementado com polpa de banana promoveram crescimento, tanto no cultivo *in vitro* quanto na aclimatização das mudas. Dessa forma, recomenda-se o cultivo em biorreator utilizando o meio MS + PB tanto para o crescimento *in vitro* quanto para o estabelecimento *ex vitro* de *C. nobilior*.

Palavras chaves: Orchidaceae, Biorreator, Produção.

CULTIVATION MEDIUM AND MICROPROPAGATION SYSTEMS IN THE IN VITRO GROWTH AND EX VITRO ESTABLISHMENT OF ORCHIDS NATIVE OF THE CERRADO

ABSTRACT

The Orchidaceae family has great representation in the Brazilian Cerrado, however, the beauty and diversity of its flowers makes some species suffer predatory collection. One way to reduce the vulnerability of these orchids due to extractivism is commercial production. Thus, the objective was to evaluate the production and conservation of three native species from the Cerrado, through *in vitro* cultivation techniques. Two experiments were carried out at the Laboratory of *In vitro* Cultivation of Flowers and Ornamental Plants, one of them in partnership with the Laboratory of Biotechnology and Genetic Improvement of Sugarcane, both from the Faculty of Agricultural Sciences (FCA) of the Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD). The first experiment aimed to evaluate the *in vitro* growth of *Cattleya nobilior* Rchb.f., *Cattleya walkeriana* Gardner and *Schomburgkia crispa* Lindl., cultivated by different systems of myxotrophic *in vitro* culture system that allows gas exchange, using culture media supplemented with different organic materials without addition sucrose (1) MS; 2) MS + banana pulp (PB); 3) MS + coconut water (AC); 4) MS + banana flour (FB); 5) MS + PB + AC; 6) MS + FB + AC), as well as *ex vitro* establishment. For *C. nobilior*, the MS medium combined with banana pulp and coconut water provided the greatest *in vitro* growth and *ex vitro* establishment of the plants. For *C. walkeriana*, the cultivation in MS medium supplemented only with coconut water was favorable for the *in vitro* growth and acclimatization of the seedlings. For *S. crispa*, the culture medium that favored both *in vitro* growth and acclimatization of plants was MS supplemented with banana pulp. The second experiment aimed to evaluate the *in vitro* growth of *C. nobilior* cultivated in different micropropagation systems (1) conventional system (SC); 2) temporary immersion bioreactor (BIT)) and culture media (1) MS; 2) MS + banana pulp (PB); 3) MS + coconut water (AC); 4) MS + PB + AC), in addition to the *ex vitro* establishment of plants from *in vitro* cultivation. Cultivation in a temporary immersion bioreactor using MS medium supplemented with banana pulp promoted growth, both in *in vitro* cultivation and in the acclimatization of seedlings. In this way, cultivation in a bioreactor using MS + PB medium is recommended both for *in vitro* growth and for the *ex vitro* establishment of *C. nobilior*.

Keywords: Orchidaceae, Bioreactor, Production.

INTRODUÇÃO GERAL

A produção de flores e plantas ornamentais é uma das atividades mais lucrativas no agronegócio brasileiro, com maior concentração no estado de São Paulo (48,9%), principalmente ao redor dos municípios de Atibaia e Holambra (JUNQUEIRA e PEETZ, 2018). As orquídeas se encontram entre as mais apreciadas pelos consumidores e apresentam alto valor agregado, podendo ser comercializadas em vasos ou na forma de flores de corte para decoração, destacando-se como plantas ornamentais que mais contribuem com a economia brasileira (FARIA e COLOMBO, 2015; HUNHOFF et al., 2016; SCHOENMAKER, 2017).

As orquídeas pertencem à família Orchidaceae, considerada uma das maiores e mais diversificadas dentre as Angiospermas (CHASE et al., 2015; THE PLANT LIST, 2021). De acordo com a Flora do Brasil em Construção (2021), o Brasil apresenta 2.692 espécies registradas, sendo 1.490 endêmicas, distribuídas principalmente na Mata Atlântica, Amazônia e Cerrado.

Esta família é a terceira mais representativa do Cerrado, sendo composta, neste bioma, por 642 espécies (FLORA DO BRASIL EM CONSTRUÇÃO, 2021). Dentre as espécies que encontram-se nessas áreas estão *Cattleya nobilior* Rchb.f., *Cattleya walkeriana* Gardner e *Schomburgkia crispa* Lindl. A *Cattleya nobilior* Rchb.f. é uma planta epífita ou rupícola, nativa, neotropical e bastante cultivada devido à beleza de suas flores. Possui aproximadamente 10-20 cm de altura, apresenta inflorescências, geralmente contendo de uma a três flores, com coloração rosa/escuro ou rosa claro/lilás (Figura 1) e com durabilidade relativamente longa (BFG, 2018). Por essas características, a espécie vem sendo coletada de maneira irregular para fins de comercialização, o que pode acarretar numa categoria de ameaça em um futuro próximo (BIANCHETTI, 2007; SILVA et al., 2009; CNCFlora, 2012a).



FIGURA 1. *Cattleya nobilior* Rcbh.f., aspecto morfológico da flor. Foto: Sorgato, J. C. 2018.

A *Cattleya walkeriana* Gardner é uma orquídea com hábito epifítico ou rupícola, nativa e endêmica do Brasil. Ocorre em diferentes ambientes como floresta rupícola, estacional semidecidual e cerradão (CNCFlora,2012b), sendo uma espécie de pequeno porte (pseudobulbos até 10 cm) (FLORA DO BRASIL EM CONSTRUÇÃO, 2021). Suas flores possuem uma coloração rosa escuro a claro (Figura 2) (ARAÚJO 2017) e apresenta elevado valor ornamental, sendo considerada vulnerável pela Lista Vermelha da Flora do Brasil devido à coleta indiscriminada (CNCFlora,2012b).



FIGURA 2. *Cattleya walkeriana* Gardner, aspecto morfológico da flor. Foto: Ribeiro, L. M. 2018.

Já a *Schomburgkia crisper* Lindl., é uma epífita encontrada tanto em matas ciliares quanto em matas secas do Bioma Cerrado (OSTETTO, 2015; BARROS et al., 2018), com pseudobulbos bifoliados com comprimento de 8 a 10 cm. Além do potencial ornamental (SORGATO et al., 2021a), *S. crisper* apresenta propriedades medicinais e farmacológicas, devido a presença de um composto denominado ácido crispóico que, segundo Belloto et al. (2017) tem potencial anticarcinogênico (Figura 3).



FIGURA 3. *Schomburgkia crisper* Lindl., aspecto morfológico da flor. Foto: Sorgato, J. C. 2019.

Essas plantas possuem o ciclo de vida altamente especializado, o que difere da maioria das famílias botânicas. Em seu hábitat, as sementes de orquídeas apresentam dificuldade em sua germinação, pois as mesmas não possuem reservas nutritivas suficientes (SOARES et al., 2017), o que somado à coleta indiscriminada, pode resultar na vulnerabilidade dessa família (FARIA et al., 2012).

A propagação sexuada de espécies de orquídeas em ambiente natural é lenta, apresentando uma baixa taxa de germinação de sementes (2 a 3%), dependentes de associação simbiótica com fungos micorrízicos (CORRIE e TANDON, 1993). Desse modo, uma alternativa bastante estudada afim de reduzir tais problemas é o cultivo *in vitro* (ARAUJO, et al., 2009; SILVA et al., 2016a). As espécies vegetais podem ser propagadas *in vitro* de duas maneiras, sendo por via seminífera, que apresenta grandes variações devido a segregação e recombinação gênica, ou por via vegetativa, baseada na capacidade de regeneração de parte da planta a partir de explantes (BOWMAN e ALBRECHT, 2017; ESKANDARI et al., 2017), sendo que para as espécies nativas, a via seminífera garante a variabilidade genética necessária no ambiente natural.

As técnicas de propagação *in vitro* apresentam inúmeras vantagens. Além da obtenção de um grande número de mudas em um curto espaço de tempo, possuem capacidade de produzir plantas isentas de pragas e doenças, podendo propagar em qualquer época do ano devido às condições laboratoriais serem controladas (VIJENDRA et al., 2017). Nesse sentido, vem sendo utilizado diferentes sistemas de cultivo para obtenção de mudas em larga escala, tais como o sistema convencional e os biorreatores, destacando-se principalmente os biorreatores de imersão temporária.

Os sistemas convencionais de propagação *in vitro*, denominados heterotróficos, utilizam frascos que não possibilitam trocas gasosas, uma vez que são vedados, nos quais o meio de cultivo é suplementado com uma fonte de carbono que é a única fonte de energia para o desenvolvimento da planta (SILVA et al., 2019). E esse sistema apresenta alta umidade e baixa irradiância, fatores responsáveis por alterações morfo-fisiológicas das plantas (SILVA et al., 2016b).

No entanto, para favorecer o crescimento das plantas, tem-se utilizado materiais mais porosos como algodão ou filtros permeáveis, o que proporciona trocas gasosas entre o interior do frasco e o ar atmosférico, sendo esse chamado de sistema de ventilação natural (SILVA et al., 2016b). Ribeiro et al. (2019) estudando a influência do sistema de micropropagação (convencional e ventilação natural) no crescimento de plantas de *Dendrobium bigibbum* Lindl., verificaram que a utilização de frascos com trocas gasosas promoveu mudas mais vigorosas, sendo esta condição ambiental a mais indicada para o cultivo dessa espécie. Da mesma forma, Silva et al. (2015a) verificaram que o mesmo sistema de cultivo promoveu de forma positiva o crescimento *in vitro* de plantas de *Cattleya walkeriana* Gardner.

O sistema de biorreator de imersão temporária propicia o contato temporário do material vegetal com o meio nutritivo líquido, permitindo frequências diferentes de imersão com controle sobre a duração de cada uma delas (VENDRAME e KHODDAMZADEH, 2016), o que pode minimizar distúrbios fisiológicos que afetam o crescimento e desenvolvimento da planta devido ao acúmulo de água no interior das células e tecidos vegetais (TEIXEIRA e CID, 2010).

Desse modo, o uso de biorreatores para a propagação de orquídeas apresenta vantagens como produção mais rápida de maior número de mudas e redução de custos de produção e mão de obra (HOSSAIN et al., 2013). Moreira et al. (2013) relataram que para a espécie *C. walkeriana*, o biorreator de imersão temporária foi o melhor sistema de

propagação, resultando em plantas com maior crescimento da parte aérea e sistema radicular.

Durante o cultivo *in vitro*, as plântulas são submetidas a condições específicas, tais como, diferentes formulações nutritivas, sistemas de micropropagação propiciando ou não trocas gasosas e salas de crescimento com condições de luminosidade distintas, acarretando em fatores que podem ser limitantes para seu estabelecimento (US-CAMAS et al., 2014).

Os meios de cultivo são responsáveis por oferecer todos os macronutrientes e micronutrientes necessários para o desenvolvimento de uma cultura *in vitro*. Segundo Silva, 2015b; Vudala e Ribas, 2017, dentre os meios mais utilizados para o cultivo de orquídeas, destaca-se o meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), que tem sido combinado com extratos naturais de polpa de banana e água de coco, que possuem seus próprios sais minerais, além de auxinas, citocininas e giberelinas, afim de proporcionar melhor crescimento de plantas (MACHADO e ZAMARIAN, 2020; DOLCE et al., 2020). Gonçalves et al. (2016), estudando a utilização desses suplementos orgânicos no cultivo *in vitro* do híbrido intergenérico *Laeliocattleya*, verificaram que a adição de polpa de banana no meio de cultivo Knudson, aumentou o número de raízes, enquanto a adição de água de coco favoreceu o desenvolvimento de folhas e ramos.

Outro fator que pode influenciar no cultivo *in vitro* é a condição de luz que atua em diversos processos metabólicos dos vegetais, tais como, fotossíntese, cadeia transportadora de elétrons e síntese de ATP. As lâmpadas fluorescentes brancas são fonte de luz mais utilizadas em laboratórios de cultura de tecidos de plantas (ROCHA et al., 2010), porém sua substituição por diodos emissores de luz (LEDs) vem sendo cada vez mais estudada, uma vez que os LEDs apresentam diversas vantagens. Estes são dispositivos semicondutores capazes de produzir alto fluxo luminoso com baixa emissão de calor e possuem capacidade de manter sua eficiência de luz por anos (SINGH et al., 2015).

O uso de LEDs na micropropagação de plantas, além de proporcionar redução de custos com relação à energia elétrica, podem proporcionar maior comprimento e número de brotações, incrementar a taxa de multiplicação dos explantes e a concentração de pigmentos fotossintetizantes devido à melhoria na qualidade de luz, pois a mesma desempenha um fator chave na propagação *in vitro*, influenciando no crescimento e desenvolvimento de plantas, por meio da elevada taxa fotossintética com influência positiva na fotomorfogênese (ROCHA et al., 2015; BELLO, 2016; ROCHA et al., 2017).

Desse modo, os sistemas de iluminação LEDs desempenham um papel fundamental na horticultura ornamental, fornecendo um espectro de luz adequado (qualidade e duração), além de permitir ajustes de irradiância aos fotorreceptores das plantas (SINGH et al., 2015). Essa tecnologia vem ganhando destaque no cultivo *in vitro* de orquídeas (MENGXI et al., 2011). Assim, pesquisas sobre efeito de luz no cultivo *in vitro* vem sendo realizadas em diferentes espécies como *Cattleya loddigesii* Lindl. (GALDIANO JÚNIOR, et al., 2012), *Oncidium baueri* Lindl. (CAMARGO et al., 2015), e *Schomburgkia crispa* Lindl. (SORGATO et al., 2021b).

O êxito do cultivo *in vitro* também está relacionado com a transferência das plantas do ambiente *in vitro* para o *ex vitro*. O período de aclimatização consiste em transferir as plantas micropropagadas para casa de vegetação, telado ou estufa, com o objetivo de suportar a troca de ambiente, antes de serem levadas para seu local definido (ALMEIDA et al., 2015). Portanto, a fase de aclimatização é considerada uma etapa crítica para muitas espécies, e as mudas oriundas de cultivo *in vitro* podem ser afetadas por fatores ambientais e também pelas características do padrão morfológico das mesmas (GONÇALVES et al., 2019). Além disso, o uso de LEDs como fonte de luz durante o cultivo *in vitro* pode ser estudado com intuito de contribuir na adaptabilidade e desempenho das plantas após sua transferência para o ambiente *ex vitro*, além de aumentar a taxa de sobrevivência (FERREIRA et al., 2017; GUPTA e AGARWAL, 2017).

Nesse contexto, novas tecnologias utilizadas na propagação de orquídeas requerem a otimização das técnicas e melhorias nas condições de cultivo *in vitro* e *ex vitro* para as espécies *C. nobilior*, *C. walkeriana* e *S. crispa*, visando a obtenção de mudas de qualidade, produção em larga escala em menor tempo, tanto para a manutenção da biodiversidade quanto para proporcionar valores competitivos de mercado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, N. M.; PACHECO JUNIOR, R. G.; CÉZAR, J. D. O.; GONÇALVES, H. Á.; SOUZA, A. D. S. Produção de mudas micropropagadas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) em larga escala: uma inovação tecnológica. In: **Embrapa Mandioca e Fruticultura-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: Congresso brasileiro de mandioca, 16. Congresso latino-americano e caribenho de mandioca, 2015, Foz do Iguaçu. Integração: segurança alimentar e geração de renda: anais. Foz do Iguaçu: SBM, 2015.
- ARAUJO, A. G.; PASQUAL, M.; MIYATA, L. Y.; CASTRO, E. M.; ROCHA, H. S. Qualidade de luz na biometria e anatomia de plântulas *Cattleya loddigesii* L. (Orchidaceae) micropropagadas. **Ciência Rural**, v. 39, p. 2506-2511, 2009.
- ARAÚJO, R. 2017. **Orquídeas Walkeriana**. Editora Europa, São Paulo. 79 p.
- BARROS, F.; HALL, C. F.; PAIVA NETO, V. B.; BATISTA, J. A. N. Check-list das Orchidaceae do estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. **Iheringia Série Botânica**, v. 73, p. 287-296, 2018.
- BELLO, J. J. B.; ESTRADA, E. M.; VELÁZQUEZ, J. H. C.; RAMOS, V. M. Effect of LED light quality on *in vitro* shoot proliferation and growth of vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews). **African Journal of Biotechnology**, v. 15, p. 272-277, 2016.
- BELLOTO, C. A.; SOUZA, G. K.; PERIN, P. C.; SCHUQUEL, I. T. A.; SANTIN, S. M. O.; CHIAVELLI, L. U. R.; GARCIA, F. P.; KAPLUM, V.; RODRIGUES, J. H. S.; SCARIOT, D. B.; DELVECCHIO, R.; MACHADO-FERREIRA, E.; AGUIAR, R. S.; SOARES, C. A. G.; NAKAMURA, C. V.; POMINI, A. M. Crispoic acid, a new compound from *Laelia marginata* (Orchidaceae), and biological evaluations against parasites, human cancer cell lines and Zika virus, **Natural Product Research**, Londres, v. 31, p. 1-6, 2017.
- BFG - The Brazil Flora Group. Brazilian Flora 2020: innovation and collaboration to meet Target 1 of the Global Strategy for Plant Conservation (GSPC). **Rodriguésia**, v. 69, p. 1513-1527, 2018.
- BIANCHETTI, L. B. *Cattleya nobilior* Rehb. f. **Heringeriana**, v. 1, p. 9-10, 2007.
- BOWMAN, K. D.; ALBRECHT, U. Efficient propagation of citrus rootstocks by stem cuttings. **Scientia horticulturae**, v. 225, p. 681-688, 2017.
- CAMARGO, S. S.; RODRIGUES, D. B.; RODRIGUES, C. M.; ASSIS, A. M. D.; FARIA, R. T. D.; SCHUCH, M. W. Fitorreguladores e espectros de luz na micropropagação de *Oncidium baueri* Lindl. **Ciência Rural**, v. 45, p. 2007-2012, 2015.
- CHASE, M. W.; CAMERON, K. M.; FREUDENSTEIN, J. V.; PRIDGEON, A. M.; SALAZAR, G.; VAN DEN BERG, C.; SCHUITEMAN, A. An updated classification of Orchidaceae. **Botanical journal of the Linnean Society**, v. 177, p. 151-174, 2015.

CNCFlora (2012a). *Cattleya nobilior* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2. Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Cattleya nobilior](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Cattleya_nobilior)>. Acesso em 19 outubro 2020.

CNCFlora (2012b) *Cattleya walkeriana* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012. Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Cattleya walkeriana](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Cattleya_walkeriana)>. Acesso em 15 março 2021.

CORRIE, S.; TANDON, P. Propagation of *Cymbidium giganteum* Wall. Through high frequency conversion of encapsulated protocorms under *in vitro* and *in vivo* conditions. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 31, p. 61-64, 1993.

DOLCE, N. R.; MEDINA, R. D.; TERADA, G.; GONZÁLEZ-ARNAO, M. T.; FLACHSLAND, E. A. *In Vitro* Propagation and Germplasm Conservation of Wild Orchids from South America. **Orchid Biology: Recent Trends e Challenges**, p. 37-94, 2020.

ESKANDARI, B. S.; GHADERIAN, S. M.; GHASEMI, R.; SCHAT, H. Optimization of seed germination in an Iranian serpentine endemic, *Fortuynia garcinii*. **Flora**, v. 231, p. 38-42, 2017.

FARIA, R. T. D.; COLOMBO, R. C. Oncidium: a orquídea em expansão no cenário florícola. **Horticultura Brasileira**, v. 33, p. 533-533, 2015.

FARIA, R. T.; ASSIS, A. M.; UNEMOTO, L. K.; CARVALHO, J. F. R. P. Produção de orquídeas em laboratório. **Londrina: Mecenaz**, v. 124, 2012.

FERREIRA, L. T.; DE ARAÚJO SILVA, M. M.; ULISSES, C., CAMARA; T. R.; WILLADINO, L. Using LED lighting in somatic embryogenesis and micropropagation of an elite sugarcane variety and its effect on redox metabolism during acclimatization. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 128, p. 211-221, 2017.

FLORA DO BRASIL 2020 EM CONSTRUÇÃO. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB179>>. Acesso em: 10 fev. 2021.

GALDIANO JÚNIOR, R. F.; MANTOVANI, C.; PIVETTA, K. F. L.; LEMOS, E. G. M. Crescimento *in vitro* e aclimatização de *Cattleya loddigesii* Lindley (Orchidaceae) com carvão ativado sob dois espectros luminosos. **Ciência Rural**, v. 42, p. 801-807, 2012.

GONÇALVES, L. M.; MACHADO, P. S.; DE FÁTIMA, M.; BALLESTA, P.; MORA, F.; MILANEZE GUTIERRE, M. A.; MANGOLIN, C. A. Suplementos orgânicos para el cultivo *in vitro* del híbrido *Laelio cattleya* (Orchidaceae). **Idesia (Arica)**, v. 34, p. 47-54, 2016.

GONÇALVES, W.; DE ALMEIDA, J. A. S.; SALOMON, M. V.; GUERREIRO-FILHO, O. **Aclimatização e aclimação de mudas micropropagadas de híbrido f₁ de *Coffea arabica* L.** X Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. ACLIMATIZAÇÃO, Vitória – ES, p. 6, 2019.

GUPTA, S. D.; AGARWAL, A. Influence of LED lighting on in vitro plant regeneration and associated cellular redox balance. In: **Light emitting diodes for agriculture**. Springer, Singapore, p. 273-303, 2017.

HOSSAIN, M. M.; KANT, R.; VAN, P. T.; WINARTO, B.; ZENG, S.; TEIXEIRA DA SILVA, J. A. The application of biotechnology to orchids. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 32, p. 69-139, 2013.

HUNHOFF, V. L.; SILVA, C. A.; LAGE, L. A.; KRAUSE, W.; PALÚ, E. G. Biologia, morfologia floral e potencial ornamental de *Cyrtopodium saintlegerianum* (Orchidaceae). **Revista AgroAmbiente**, v. 10, p.358– 363, 2016.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. S. Sustainability in Brazilian floriculture: introductory notes to a systemic approach. **Ornamental Horticulture**, v. 24, p. 155-162, 2018.

MACHADO, W.; ZAMARIAN, A. S. Polpa de Banana, Água de Coco e Carvão Ativado no Desenvolvimento *in vitro* de *Lycaste* sp. **Ensaio e Ciência C Biológicas Agrárias e da Saúde**, v. 24, p. 159-163, 2020.

MENGXI, L.; ZHIGANG, X.; YANG, Y.; YIJIE, F. Effects of different spectral lights on *Oncidium* PLBs induction, proliferation, and plant regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 106, p. 1-10, 2011.

MOREIRA, A. L.; SILVA, A. B. D.; SANTOS, A.; REIS, C. O. D.; LANDGRAF, P. R. C. *Cattleya walkeriana* growth in different micropropagation systems. **Ciência Rural**, v. 43, p. 1804-1810, 2013.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiology Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

OSTETTO, S. **Orquídeas de Mato Grosso do Sul**. Campo Grande: Alvorada, v. 1, p. 141, 2015.

RIBEIRO, L. M.; SORGATO, J. C.; SCALON, S. D. P. Q.; SOARES, J. S.; RIBEIRO, I. S. Influência da luz, ventilação natural e tamanho do frasco no crescimento e desenvolvimento de denphal (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias (Agrária)**, v. 14, p. 5957, 2019.

ROCHA, P. S. G. D.; OLIVEIRA, R. P. D.; SCIVITTARO, W. B.; SANTOS, U. L. D. Light-emitting diodes and BAP concentrations in the *in vitro* strawberry multiplication. **Ciência Rural**, v. 40, p. 1922-1928, 2010.

ROCHA, P. S. G.; DE OLIVEIRA, R. P.; SCIVITTARO, W. B. New light sources for *in vitro* potato micropropagation. **Bioscience Journal**. v. 31, p. 1312-1318, 2015.

ROCHA, P. S. G.; DE OLIVEIRA, R. P.; SCIVITTARO, W. B.; MOSELE, S. H. Uso de LEDs na multiplicação *in vitro* de três cultivares de bananeira. **Revista Colombiana de Ciências Hortícolas**, v. 11, p. 247-252, 2017.

SCHOENMAKER, K. **Boletim Informativo Ibraflor**. v. 81, 2017.

SILVA, A. B.; LIMA, P. P.; DE OLIVEIRA, L. E. S.; MOREIRA, A. L. Crescimento *in vitro* e anatomia foliar de *Cattleya walkeriana* (Gardner, 1839) cultivada em sistema de ventilação natural. **Ceres**, v. 61, n. 6, 2015a.

SILVA, A. B.; REIS, C. O.; CAZETTA, J. O.; CARLIN, S. D.; LANDGRAF, P. R. C.; REIS, M. C. Effects of exogenous proline and a natural ventilation system on the *in vitro* growth of orchids. **Bioscience Journal**, v. 32, p. 619-626, 2016b.

SILVA, C. DE S.; ARAÚJO, L. G. DE; SOUSA, K. C. I.; CARVALHO, J. C. B. DE; GONÇALVES, L. DE A.; CARNEIRO, L. L. Cultivo *in vitro* de *Epidendrum nocturnum* (Orchidaceae) ocorrente no Cerrado da região Centro-Oeste. **Rodriguésia**, v. 67, n. 4, 2016a.

SILVA, E. F.; VILLA, F.; PASQUAL, M. Meio de cultura knudson modificado utilizado no cultivo *in vitro* de um híbrido de orquídea. **Scientia Agraria**, v. 10, p. 267-274, 2009.

SILVA, J. A. T.; TSAVKELOVA, E. A.; NG, T. B.; PARTHIBHAN, S.; DOBRÁNSZKI, J.; CARDOSO, J. C.; RAO, M. V.; ZENG, S. Asymbiotic *in vitro* seed propagation of *Dendrobium*. **Plant cell reports**, v. 34, p. 1685-1706, 2015b.

SILVA, T. D.; CHAGAS, K.; BATISTA, D. S.; FELIPE, S. H. S.; LOUBACK, E.; MACHADO, L. T.; FERNANDES, A. M.; BUTTRÓS, V. H. T.; KOEHLER, A. D.; FARIAS, L. M.; SANTOS, A. F.; SILVA, P. O.; OTONI, W. C. Morphophysiological *in vitro* performance of Brazilian ginseng (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen) based on culture medium formulations. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 55, p. 454-467, 2019.

SINGH, D.; BASU, C.; MEINHARDT-WOLLWEBER, M.; ROTH, B. LEDs for energy efficient greenhouse lighting. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 49, p. 139-147, 2015.

SOARES, J. S.; RIBEIRO, L. M.; SORGATO, J. C. Germinação e crescimento *in vitro* de *Dendrobium nobile* Lindl. sem subcultivo em meio de cultura alternativo/seed quantity on *in vitro* cultivation of *Dendrobium nobile* Lindl. in alternative culture media without subculture. **Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas**, v. 11, p. 365-372, 2017.

SORGATO, J. C.; MUDOLON, E. D.; GUIMARÃES, F. F.; SOARES, J. S.; RIBEIRO, L. M. Light sources on the germination and initial *in vitro* establishment of *Schomburgkia crispera* Lindl., a species of the Brazilian Cerrado. **Ciência Rural**, v. 51, n. 3, 2021a.
SORGATO, J. C.; SOARES, J. S.; RIBEIRO, L. M.; CABRAL, A. G. Ornamental potential of *Schomburgkia crispera* Lindl. **Ornamental Horticulture**, v. 27, p. 155-161, 2021b.

TEIXEIRA, J. B.; CID, LPB. Biorreatores para produção de mudas em larga escala. **CID, L. PB (Ed.). Cultivo *in vitro* de plantas**, v. 3, p. 159-178, 2010.

THE PLANT LIST. 2018. Disponível em: <www.theplantlist.org>. Acesso em 18 de março de 2021.

US-CAMAS, R.; RIVERA-SOLÍS, G.; DUARTE-AKÉ, F.; DE-LA-PEÑA, C. *In vitro* culture: an epigenetic challenge for plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, London, v. 118, p. 187-201, 2014.

VENDRAME, W. A.; KHODDAMZADEH, A. A. Orchid biotechnology. **Horticultural Reviews**, v. 44, p. 173-228, 2016.

VIJENDRA, P. D.; JAYANNA, S. G.; KUMAR, V.; GAJULA, H.; RAJASHEKAR, J.; SANNABOMMAJI, T.; BASAPPA, G.; ANURADHA, C. M. Rapid *in vitro* propagation of *Lucas aspera* Spreng. A potential multipurpose Indian medicinal herb. **Industrial crops and products**, v. 107, p. 281-287, 2017.

VUDALA, S. M.; RIBAS, L. L. F. Seed storage and asymbiotic germination of *Hadrolaelia grandis* (Orchidaceae). **South African Journal of Botany**, v. 108, p. 1-7, 2017.

CAPÍTULO I – MEIOS ALTERNATIVOS NO CRESCIMENTO *IN VITRO* E ESTABELECIMENTO *EX VITRO* DE ORQUÍDEAS NATIVAS DO CERRADO

RESUMO

A coleta indiscriminada de orquídeas nativas do Cerrado constitui um fator relevante para a diminuição das populações nesse Bioma, o que reitera a necessidade de estudos para o estabelecimento de metodologias visando sua produção e conservação. Assim, objetivou-se avaliar o crescimento *in vitro* e o estabelecimento *ex vitro* de *Cattleya nobilior* Rchb.f., *Cattleya walkeriana* Gardner e *Schomburgkia crispa* Lindl. propagadas em sistema de micropropagação que permite trocas gasosas, utilizando-se meios de cultivo suplementados com diferentes compostos orgânicos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, constituído por seis tratamentos com cinco repetições de um frasco cada. Para o início do período experimental, foram utilizadas plântulas cultivadas *in vitro* por 180 dias, sendo retiradas dos frascos, lavadas e transferidas para os seguintes meios de cultivo: 1- MS; 2- MS + polpa de banana (PB); 3- MS + água de coco (AC); 4- MS + farinha de banana (FB); 5- MS + PB + AC ou 6- MS + FB + AC. Após 180 dias de cultivo *in vitro*, o material vegetal foi avaliado quanto ao número de folhas e de raízes, comprimento da maior folha e maior raiz, altura de planta, diâmetro do pseudobulbo, número de brotações e massa fresca total. Em seguida, as plantas foram acondicionadas em substrato (esfagno rosa + fibra de coco) e transferidas para o ambiente *ex vitro*. Com intuito de investigar a hipótese de aumento no crescimento das plantas durante a fase *ex vitro*, após 180 dias, as plantas foram avaliadas quanto à sobrevivência e às mesmas características iniciais. Para *C. nobilior*, o meio MS + PB + AC promoveu o crescimento *in vitro* e favoreceu a fase de aclimatização. Para *C. walkeriana*, o cultivo em meio MS + AC proporcionou o crescimento *in vitro* e estabelecimento *ex vitro*. Para *S. crispa*, o cultivo *in vitro* em meio MS + PB favoreceu tanto o crescimento *in vitro* quanto a aclimatização das plantas. Desse modo, recomenda-se os meios alternativos para o cultivo *in vitro* e *ex vitro* dessas espécies.

Palavras- chave: Orchidaceae, Micropropagação, Suplementos orgânicos.

ALTERNATIVE MEDIUM IN THE *IN VITRO* GROWTH AND ESTABLISHMENT *EX VITRO* OF ORCHIDS NATIVE OF THE CERRADO

ABSTRACT

The indiscriminate collection of native orchids from the Cerrado is a relevant factor for the reduction of populations in this Biome, which reiterates the need for studies to establish methodologies aimed at their production and conservation. Thus, the objective was to evaluate the *in vitro* growth and *ex vitro* establishment of *Cattleya nobilior* Rchb.f., *Cattleya walkeriana* Gardner and *Schomburgkia crispa* Lindl. propagated in a micropropagation system that allows gas exchange, using culture media supplemented with different organic compounds, as well as *ex vitro* establishment. The experimental design was completely randomized, consisting of six treatments with five replicates of one flask each. For the beginning of the experimental period, seedlings cultivated *in vitro* for 180 days were used, being removed from the flasks, washed and transferred to the following culture media: 1) MS; 2) MS + banana pulp (PB); 3) MS + coconut water (AC); 4) MS + banana flour (FB); 5) MS + PB + AC; 6) MS + FB + AC. After 180 days of cultivation, the number of leaves and roots, length of the largest leaf and root, plant height, pseudobulb diameter, number of shoots and total fresh mass were evaluated. Afterwards, the plants were placed in substrate (pink sphagnum + coconut fiber) and transferred to the *ex vitro* environment. In order to investigate the hypothesis of increased plant growth during the *ex vitro* phase, after 180 days, the plants were evaluated for survival and the same initial characteristics. For *C. nobilior*, the MS + PB + AC medium promoted *in vitro* growth and favored the acclimatization phase. For *C. walkeriana*, cultivation in MS + AC medium provided *in vitro* growth and *ex vitro* establishment. For *S. crispa*, *in vitro* cultivation in MS + PB medium favored both *in vitro* growth and acclimatization of plants. Thus, it is recommended alternative media for the *in vitro* and *ex vitro* cultivation of these species.

Keywords: Orchidaceae, Micropropagation, Organic Supplements.

INTRODUÇÃO

As orquídeas pertencem a família Orchidaceae e estão entre as plantas ornamentais mais apreciadas devido à beleza de suas flores, diversidade de cores e formas. Essas plantas originaram na Malásia, há milhões de anos, quando a maioria das famílias das angiospermas tornaram-se diferenciadas (GARAY, 1972). No Brasil, a família é composta por 251 gêneros, dos quais fazem parte 2.692 espécies, sendo 1.490 endêmicas (FLORA DO BRASIL EM CONSTRUÇÃO, 2021).

De acordo com a Flora do Brasil em construção (2021), o território brasileiro abriga espécies de orquídeas em seis domínios fitogeográficos, sendo considerado o Cerrado o terceiro bioma com maior representatividade, com 642 espécies. Porém, algumas espécies podem ser levadas a uma categoria de ameaça devido a coletas inadequadas em áreas nativas, o que pode ocasionar risco à sobrevivência dessas plantas, gerando uma preocupação quanto a conservação das orquídeas nessas áreas.

Entre as espécies do Cerrado que se destacam, *Cattleya nobilior* Rchb.f., conhecida como Rainha do Cerrado, é uma planta epífita ou rupícola, encontrada em matas secas e se destaca dentre as orquídeas pela capacidade de recombinação genética, estrutura, beleza e durabilidade de suas flores (SILVA et al., 2009). Assim como *C. nobilior*, a *C. walkeriana* Gardner é uma orquídea nativa, epífita ou rupícola, sendo encontrada em diferentes ambientes como floresta estacional semidecidual, floresta rupícola e Cerrado, apresentando alto valor econômico e sendo considerada vulnerável pelo Livro Vermelho da Flora do Brasil devido à coleta indiscriminada (CNCFlora, 2012). A *Schomburgkia crispa* Lindl., também é uma espécie nativa, apresenta hábito epifítico e possui elevado potencial ornamental, sendo encontrada no Cerrado e em florestas de galeria, inclusive no estado de Mato Grosso do Sul (OSTETTO, 2015, BARROS et al., 2018; SORGATO et al., 2021).

Neste contexto, é necessário otimizar os protocolos de propagação existentes para superar as limitações da conservação *in situ* de orquidáceas. Sendo assim, as técnicas de cultivo *in vitro* podem representar uma alternativa para a propagação de diversas espécies, tendo em vista que essa técnica é eficiente para o desenvolvimento de novos protocolos de propagação, obtenção de mudas destinadas à pesquisa, produção em escala comercial e preservação de espécies ameaçadas ou não de extinção (CARDOSO, 2014; SORGATO et al., 2014; HANUS-FAJERSKA e WOJCIECHOWSKA, 2017).

Diversos meios de cultivo podem ser utilizados na propagação *in vitro* de orquídeas. O meio de cultivo mais utilizado é o meio MS proposto em 1962 por Murashige e Skoog (VUDALA e RIBAS 2017). Porém, a utilização de meios alternativos, principalmente com materiais orgânicos que apresentam diversos nutrientes, vitaminas e reguladores de crescimento, podem ser uma alternativa para obtenção de um protocolo para multiplicação de diversas espécies (SU et al., 2012), principalmente as nativas, visto que são pouco estudadas. Estes suplementos possuem seus próprios sais minerais além de auxinas, citocininas e giberelinas como é o caso da polpa de banana e água de coco (MACHADO e ZAMARIAN, 2020).

Su et al. (2012) ao estudarem a influência de polpa de banana nanica em diferentes meios no cultivo *in vitro* de *Dendrobium nobile* Lindl, verificaram que em todos os meios, com exceção do MS na metade da concentração de macronutrientes, a adição de polpa de banana foi eficiente para o crescimento e desenvolvimento da espécie. Já estudos realizados por Araújo et al. (2006), constataram que o maior alongamento da parte aérea e de raiz de *Cattleya loddigesii* 'Grande' x *Cattleya loddigesii* 'Alba' foi obtido com a adição de 100 g L⁻¹ de polpa de banana ao meio Knudson e a combinação de banana com 200 mL L⁻¹ de água de coco promoveu o maior número de raízes.

Além do meio nutritivo, os sistemas convencionais de propagação *in vitro* utilizam frascos com vedação hermética, e as plantas quando cultivadas nesse sistema apresentam metabolismo heterotrófico (CARNEIRO, 2014). Por esse motivo, para permitir trocas gasosas entre o meio interno e externo do frasco de cultivo foi proposto o sistema mixotrófico, com o objetivo de reduzir o acúmulo de etileno dentro dos frascos e favorecer o desenvolvimento de algumas espécies quando cultivadas *in vitro* (CARDOSO, 2015). O crescimento das plantas, tem sido favorecido pela utilização de materiais mais porosos como algodão ou filtros permeáveis, o que proporcionam as trocas gasosas (SILVA et al., 2016, RIBEIRO et al., 2019).

Assim, a utilização de sistemas que permitem trocas gasosas em conjunto com a adição de compostos orgânicos ao meio de cultura pode influenciar no desenvolvimento *in vitro* e estabelecimento *ex vitro* de orquídeas nativas do Cerrado. Objetivou-se avaliar o crescimento *in vitro* de *C. nobilior*, *C. walkeriana* e *S. crispa* propagadas em diferentes meios de cultivo suplementados com materiais orgânicos, e posterior estabelecimento *ex vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Condições gerais

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultivo *in vitro* de Flores e Plantas Ornamentais e no viveiro na área de Jardinocultura da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) (22°11'53.2"S; 54°56'02.3"W), Dourados – MS, Brasil.

Para o estudo, foram utilizadas plantas de *Cattleya nobilior* Rchb.f., *Cattleya walkeriana* Gardner e *Schomburgkia crispa* Lindl., obtidas a partir de germinação assimiótica. Essas sementes foram provenientes de frutos maduros de plantas matrizes cultivadas em Orquidário da Faculdade de Ciências Agrárias da UFGD e foram submetidas ao teste de tetrazólio, seguindo metodologia proposta por Soares et al. (2021) e Ribeiro et al. (2021). Após a confirmação da viabilidade, amostras de 0,05 g de sementes de cada espécie foram levadas para ambiente asséptico e desinfestadas com 15 mL de solução de hipoclorito de sódio a 0,8%, por 5 minutos. Em seguida, receberam tríplice lavagem com água destilada. Logo após, o volume da suspensão foi completado para 50 mL com água destilada estéril para a realização da semeadura *in vitro* (SOARES et al., 2020).

Na primeira etapa, como meio de cultivo, utilizou-se para a germinação das sementes, o meio MS de Murashige e Skoog (1962), na metade da concentração de sais (MS ½). O pH do meio foi aferido e ajustado para 5,8 antes da esterilização em autoclave, realizada a 121°C por 20 minutos. A semeadura foi realizada com o auxílio de um pipetador automático inoculando-se 1,0 mL da suspensão de sementes por frasco, e em seguida o material foi acondicionado em sala de crescimento com temperatura, irradiância e fotoperíodo controlados (25±2 °C; 18,9 μmol m⁻²s⁻¹; 16 h, respectivamente) por 180 dias, sendo subcultivadas por uma vez aos 90 dias.

Cultivo *in vitro*

Decorridos 180 dias, as plantas com aproximadamente 2,0 ± 0,5 cm de altura, foram transferidas, em ambiente asséptico, para os seguintes meios de cultivo: 1) MS; 2) MS + polpa de banana (PB) (100 g L⁻¹ de polpa de banana maçã); 3) MS + água de coco

in natura (AC) (100 mL L⁻¹); 4) MS + farinha de banana (Natural Life®) (FB) (25 g L⁻¹); 5) MS + PB (100 g L⁻¹) + AC (100 mL L⁻¹); 6) MS + FB (25 g L⁻¹) + AC (100 mL L⁻¹). A análise química da polpa de banana maçã e a análise físico-química da água de coco utilizadas como suplemento nos meios de cultivo podem ser observadas nos Quadros 1 e 2.

QUADRO 1. Análise química de polpa de banana maçã. Dourados – MS, UFGD, 2021.

| Composição química da polpa de banana maçã | |
|--|----------------------------|
| N | 0,90 g Kg ⁻¹ |
| P | 2,94 g Kg ⁻¹ |
| K | 1,33 g Kg ⁻¹ |
| Ca | 0,23 g Kg ⁻¹ |
| Mg | 1,09 g Kg ⁻¹ |
| S | 0,26 g Kg ⁻¹ |
| Mn | 14,19 mg Kg ⁻¹ |
| Fe | 109,86 mg Kg ⁻¹ |
| Cu | 1,99 mg Kg ⁻¹ |
| Zn | 0,03 mg Kg ⁻¹ |

N = nitrogênio, P = fósforo, K = potássio, Ca = cálcio, Mg = magnésio, S= enxofre, Mn = manganês, Fe = ferro, Cu = cobre e Zn = zinco.

*Valores das propriedades químicas da polpa de banana maçã conforme análise realizada pelo Grupo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Horticultura Ornamental (GEHORTI).

QUADRO 2. Características físico-químicas da água de coco verde.

| Análise físico-química da água de coco | |
|--|--------------------------|
| P | 3,31 g Kg ⁻¹ |
| Ca | 31,95 g Kg ⁻¹ |
| Na | 7,67 g L ⁻¹ |
| Mg | 13,93 g L ⁻¹ |
| Mn | 0,19 g L ⁻¹ |
| Fe | 0,14 g L ⁻¹ |
| K | 152,00 g L ⁻¹ |
| Cloretos | 163,56 |
| Sulfatos | 4,82 |
| C.E | 4,82 (ms/cm) |

P = fósforo, Ca = cálcio, Na = sódio, Mg = magnésio, Mn = manganês, Fe = ferro, K = potássio, C.E = condutividade elétrica.

*Valores das propriedades físico-químicas da água de coco conforme SILVA et al. (2009).

Todos os meios foram confeccionados sem adição de sacarose e solidificados com 6,0 g L⁻¹ de ágar bacteriológico (Himedia®, Índia). O pH do meio foi aferido e ajustado utilizando KOH (0,1M) até alcançar o valor de 5,8 e, na sequência foram distribuídos 60 mL do meio, a ser testado, em cada frasco com capacidade para 600 mL, sendo esterilizados em autoclave a 121°C (1,1 atm de pressão) por 20 minutos. Após os meios atingirem temperatura ambiente, os frascos foram transferidos para ambiente estéril.

Para as espécies *S. crispa* e *C. nobilior* foram inoculadas seis plantas por frasco de cultivo, para *C. walkeriana* foram três plantas, por frasco. Na sequência, os frascos foram vedados com filme de policloreto de vinila (PVC) providos de filtro de algodão (sistema de micropropagação com troca gasosa - SMTG). Posteriormente, o material foi acondicionado em sala de crescimento com fotoperíodo e temperatura controlada (16 horas; 25±2 °C, respectivamente) e irradiância fornecida por lâmpada LED 3000K (86 μmol m⁻² s⁻¹) (Sorgato et al., 2021), permanecendo nessas condições por 180 dias sem subcultivo.

Na sequência, as plantas foram retiradas dos frascos de cultivo, sendo lavadas em água corrente para total remoção do meio e avaliadas quanto ao número de folhas (NF), número de raízes (NR), comprimento da maior folha (CF) (mm), comprimento da maior raiz (CR) (mm), altura de planta (AP) (mm), diâmetro do pseudobulbo (DP) (mm) com exceção da espécie *S. crispa*, número de brotações (NB) e massa fresca total (MF) (g). Após as avaliações, os tratamentos foram fotografados com câmera acoplada em mini estúdio fotográfico.

Cultivo *ex vitro*

Após essas avaliações, todas as plantas foram transferidas para ambiente *ex vitro*. Foram utilizados recipientes de polipropileno transparentes com capacidade para 1000 mL (20 x 10 x 5 cm), providos de furos na base para drenagem do substrato e na tampa para trocas gasosas, sendo 1/3 de seu volume preenchido com esfagno rosa (Agrolink, Holambra-SP) + fibra de coco (Golden-Mix Chips, Amafibra) (1/2, v:v).

Após o plantio, as plantas foram alocadas no orquidário em viveiro coberto pela sobreposição de duas telas de sombreamento de 50%, propiciando irradiância de 235 μmol m⁻² s⁻¹, sob condições médias de temperatura e umidade relativa de 22,6±5 °C e 73,9 ± 10%, respectivamente. A irrigação foi realizada por microaspersores tipo bailarina, posicionados a um metro acima das plantas, totalizando uma lâmina de água de 1 mm dia⁻¹.

¹, permanecendo nessas condições por 180 dias. Os recipientes permaneceram tampados durante os primeiros 15 dias do período de aclimatização (pré-aclimatização).

Após 180 dias da aclimatização, as plantas foram retiradas dos recipientes e lavadas em água corrente para total remoção do substrato. Em seguida, foram avaliadas quanto à sobrevivência (SOB) e calculado o incremento das mesmas características iniciais (NF, NR, CF, CR, AP, DP, NB e MF). Com intuito de investigar a hipótese de aumento no crescimento das plantas durante a fase *ex vitro*, de acordo com os tratamentos a que foram expostas na fase *in vitro*, foram calculados seus incrementos (I) em relação aos valores iniciais por meio da expressão, proposta por Ribeiro et al. (2019), $I = (VF - VI)$ onde VI é o valor da característica antes da planta ser aclimatizada e VF é o valor da mesma característica após o período *ex vitro*, sendo seus valores expressos em porcentagem e submetidos à análise de variância.

Para cada espécie estudada foi realizada uma análise estatística separada. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, constituído por seis tratamentos com cinco repetições de um frasco cada. Os resultados foram transformados para $\sqrt{(x+1)}$ e, a seguir, submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$), utilizando o programa SISVAR (Programa de Análises Estatísticas v.5.3. Universidade Federal de Lavras, MG).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Crescimento *in vitro*

Houve efeito significativo entre os meios de cultivo para todas as características avaliadas em ambas as espécies estudadas (Quadro 3).

QUADRO 3. Resumo da análise de variância de número de folhas (NF), comprimento da maior folha (CF), número de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CR), altura de planta (AP), diâmetro do pseudobulbo (DP), número de brotações (NB) e massa fresca (MF) de *Cattleya nobilior* Rchb.f., *Cattleya walkeriana* Gardner e *Schomburgkia crispa* Lindl., em função de diferentes meios após 180 dias de cultivo *in vitro*. Dourados – MS, UFGD, 2021.

| <i>Cattleya nobilior</i> Rchb.f. | | | | | | | | | |
|------------------------------------|----|----------------|----------|----------|-----------|-----------|---------|---------|---------|
| FV | GL | Quadrado médio | | | | | | | |
| | | NF | CF | NR | CR | AP | DP | NB | MF |
| Meio | 5 | 267,07** | 506,13** | 202,21** | 1328,28** | 3047,89** | 20,34** | 46,72** | 3,64** |
| Erro | 24 | 18,87 | 38,38 | 8,93 | 263,32 | 406,5 | 0,48 | 0,83 | 0,14 |
| Média | | 9,40 | 25,56 | 9,01 | 44,66 | 72,76 | 2,02 | 2,54 | 0,95 |
| C.V. (%) | | 18,99 | 11,70 | 15,25 | 18,97 | 13,72 | 9,75 | 12,67 | 9,52 |
| <i>Cattleya walkeriana</i> Gardner | | | | | | | | | |
| FV | GL | Quadrado médio | | | | | | | |
| | | NF | CF | NR | CR | AP | DP | NB | MF |
| Meio | 5 | 90,69** | 364,00** | 20,29** | 337,63** | 1208,91** | 2,39** | 7,64** | 0,792** |
| Erro | 24 | 15,90 | 56,56 | 3,26 | 81,44 | 216,73 | 0,31 | 0,75 | 0,199 |
| Média | | 11,87 | 26,91 | 6,82 | 33,87 | 63,25 | 2,75 | 3,04 | 1,09 |
| C.V. (%) | | 16,36 | 13,75 | 10,96 | 12,92 | 11,41 | 7,72 | 11,56 | 9,74 |
| <i>Schomburgkia crispa</i> Lindl. | | | | | | | | | |
| FV | GL | Quadrado médio | | | | | | | |
| | | NF | CF | NR | CR | AP | NB | MF | |
| Meio | 5 | 1460,69** | 707,21** | 179,33** | 881,97** | 2851,62** | 64,15** | 1,76** | |
| Erro | 24 | 339,39 | 94,58 | 21,13 | 77,72 | 337,53 | 8,48 | 0,09 | |
| Média | | 24,86 | 19,38 | 10,49 | 21,19 | 46,58 | 3,91 | 0,64 | |
| C.V. (%) | | 27,01 | 24,17 | 19,37 | 19,48 | 19,46 | 22,79 | 8,92 | |

** : significativo pelo teste F à 1% de probabilidade.

F.V: fator de variação; GL: grau de liberdade.

Plantas de *C. nobilior* apresentaram maior NF (15,13) e NR (14,43) quando cultivadas em meio MS + PB + AC. Já para CF, os maiores valores foram obtidos para o

meio MS + PB, não diferindo estatisticamente dos meios MS + PB + AC e MS + FB + AC (30,79; 28,57; 28,88 mm, respectivamente). Com relação a CR e AP, os meios MS + PB, MS + FB e MS + PB + AC apresentaram as maiores médias quando comparado aos demais meios avaliados e foram iguais entre si (46,45; 53,34; 51,44 mm) e (81,47; 83,74; 81,01 mm), respectivamente. Para DP, a maior média ocorreu para plantas que foram cultivadas em meio MS + PB + AC (3,29 mm), porém sem diferença significativa do meio MS + FB (3,00 mm). Por outro lado, quando foi utilizado o meio MS + PB + AC, foram obtidos os maiores valores de NB (5,00) e MF (1,67 g) (Quadro 4).

QUADRO 4. Número de folhas (NF), comprimento da maior folha (CF) (mm), número de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CR) (mm), altura de planta (AP) (mm), diâmetro do pseudobulbo (DP) (mm), número de brotações (NB) e massa fresca (MF) (g) de *Cattleya nobilior* Rchb.f., em função de diferentes meios de cultivo (MS; MS + polpa de banana (PB); MS + água de coco (AC); MS + farinha de banana (FB); MS + PB + AC e MS + FB + AC) após 180 dias de cultivo *in vitro*. Dourados – MS, UFGD, 2021.

| Meio | Características | | | | | | | |
|--------------|-----------------|---------|---------|---------|---------|--------|--------|--------|
| | NF | CF | NR | CR | AP | DP | NB | MF |
| MS | 7,11 c | 20,10 c | 7,84 c | 43,31 b | 63,63 b | 1,12 c | 1,47 d | 0,64 c |
| MS + PB | 6,20 c | 30,79 a | 7,44 c | 46,45 a | 81,47 a | 1,64 b | 1,56 d | 0,92 b |
| MS + AC | 10,55 b | 20,86 c | 8,24 c | 34,17 b | 56,84 b | 1,36 c | 2,16 c | 0,64 c |
| MS + FB | 9,89 b | 24,16 b | 9,61 b | 53,34 a | 83,74 a | 3,00 a | 3,24 b | 1,00 b |
| MS + PB + AC | 15,13 a | 28,57 a | 14,43 a | 51,44 a | 81,01 a | 3,29 a | 5,00 a | 1,67 a |
| MS + FB + AC | 7,52 c | 28,88 a | 6,52 c | 39,25 c | 69,85 b | 1,71 b | 1,80 d | 0,84 b |
| Média | 9,40 | 25,56 | 9,01 | 44,66 | 72,76 | 2,02 | 2,54 | 0,95 |
| C.V.(%) | 18,99 | 11,70 | 15,25 | 18,97 | 13,72 | 9,75 | 12,67 | 9,52 |

Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott à 5% de probabilidade.

Na espécie *C. walkeriana*, foi observado maiores médias de NF (14,25; 17,00 e 15,66), DP (3,05; 3,16 e 3,70 mm), NB (3,75; 3,80 e 4,66) e MF (1,21; 1,41 e 1,63 g) quando as plantas foram cultivadas em meios MS + PB, MS + AC e MS + FB + AC, respectivamente, sendo ambos os meios iguais entre si. Para a variável CF, a maior média foi obtida para o meio de cultivo MS + PB (37,53 mm), porém sem diferença significativa do meio MS + PB + AC (37,30 mm). Já para NR, as maiores médias foram observadas para os meios MS + AC e MS + FB + AC (10,00 e 8,33, respectivamente). Quanto ao CR e AP, os maiores valores foram observados quando as plantas foram cultivadas nos meios MS, MS + PB, MS + PB + AC e MS + FB + AC sem diferença estatística (38,84; 36,60; 43,48 e 35,97 mm de comprimento de raiz) e (63,32; 77,65; 80,18 e 66,25 mm de altura) (Quadro 5).

QUADRO 5. Número de folhas (NF), comprimento da maior folha (CF) (mm), número de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CR) (mm), altura de planta (AP) (mm), diâmetro do pseudobulbo (DP) (mm), número de brotações (NB) e massa fresca (MF) (g) de *Cattleya walkeriana* Gardner, em função de diferentes meios de cultivo (MS; MS + polpa de banana (PB); MS + água de coco (AC); MS + farinha de banana (FB); MS + PB + AC e MS + FB + AC) após 180 dias de cultivo *in vitro*. Dourados – MS, UFGD, 2021.

| Meio | Características | | | | | | | |
|--------------|-----------------|---------|---------|---------|---------|--------|--------|--------|
| | NF | CF | NR | CR | AP | DP | NB | MF |
| MS | 7,33 b | 19,97 b | 6,33 b | 38,84 a | 63,32 a | 2,65 b | 2,66 b | 0,81 b |
| MS + PB | 14,25 a | 37,53 a | 6,50 b | 36,60 a | 77,65 a | 3,05 a | 3,75 a | 1,21 a |
| MS + AC | 17,00 a | 23,03 b | 10,00 a | 27,35 b | 53,67 b | 3,16 a | 3,80 a | 1,41 a |
| MS + FB | 7,80 b | 18,06 b | 4,60 b | 20,98 b | 38,47 b | 2,12 b | 1,40 b | 0,56 b |
| MS + PB + AC | 9,20 b | 37,30 a | 5,20 b | 43,48 a | 80,18 a | 1,84 b | 2,00 b | 0,95 b |
| MS + FB + AC | 15,66 a | 25,57 b | 8,33 a | 35,97 a | 66,25 a | 3,70 a | 4,66 a | 1,63 a |
| Média | 11,87 | 26,91 | 6,82 | 33,87 | 63,25 | 2,75 | 3,04 | 1,09 |
| C.V.(%) | 16,36 | 13,75 | 10,96 | 12,92 | 11,41 | 7,72 | 11,56 | 9,74 |

Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott à 5% de probabilidade.

Para a *S. crispa*, os resultados analisados demonstraram que, quando as plantas foram cultivadas em meio MS + PB e MS + PB + AC apresentaram maiores médias de NF (37,00 e 28,88), CR (28,20 e 28,84 mm), AP (63,31 e 55,47 mm) e MF (1,04 e 0,90 g). Para CF, a maior média foi observada somente no meio MS + PB (29,33 mm). Por outro lado, para NR os maiores valores obtidos foram observados nos meios MS, MS + PB e MS + PB + AC (10,96; 13,78 e 12,92, respectivamente) e para NB os meios de cultivo MS + PB, MS + FB e MS + PB + AC proporcionaram as maiores médias (6,17; 4,14 e 5,36, respectivamente), sendo ambos iguais estatisticamente (Quadro 6).

QUADRO 6. Número de folhas (NF), comprimento da maior folha (CF) (mm), número de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CR) (mm), altura de planta (AP) (mm), diâmetro do pseudobulbo (DP) (mm), número de brotações (NB) e massa fresca (MF) (g) de *Schomburgkia crispa* Lindl., em função de diferentes meios de cultivo (MS; MS + polpa de banana (PB); MS + água de coco (AC); MS + farinha de banana (FB); MS + PB + AC e MS + FB + AC) após 180 dias de cultivo *in vitro*. Dourados – MS, UFGD, 2021.

| Meio | Características | | | | | | |
|--------------|-----------------|---------|---------|---------|---------|--------|--------|
| | NF | CF | NR | CR | AP | NB | MF |
| MS | 25,52 b | 17,25 b | 10,96 a | 16,66 b | 41,69 b | 3,00 b | 0,48 b |
| MS + PB | 37,00 a | 29,33 a | 13,78 a | 28,20 a | 63,31 a | 6,17 a | 1,04 a |
| MS + AC | 17,56 b | 18,07 b | 9,48 b | 20,45 b | 43,84 b | 2,04 b | 0,41 b |
| MS + FB | 16,25 b | 17,03 b | 6,40 c | 15,18 b | 34,56 b | 4,14 a | 0,47 b |
| MS + PB + AC | 28,88 a | 20,63 b | 12,92 a | 28,84 a | 55,47 a | 5,36 a | 0,90 a |
| MS + FB + AC | 23,96 b | 13,99 b | 9,40 b | 17,82 b | 40,61 b | 2,80 b | 0,52 b |
| Média | 24,86 | 19,38 | 10,49 | 21,19 | 46,58 | 3,91 | 0,64 |
| C.V.(%) | 27,01 | 24,17 | 19,37 | 19,48 | 19,46 | 22,79 | 8,92 |

Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott à 5% de probabilidade.

De maneira geral, foi possível observar que os suplementos orgânicos adicionados aos meios foram benéficos para o cultivo *in vitro* das três espécies de orquídeas estudadas, sendo que para *C. nobilior* destacou-se o meio MS + PB + AC, enquanto que para *C. walkeriana* foram os meios MS + PB e MS + FB + AC, e para *S. crispa* o MS + PB. Considerando os resultados obtidos em relação ao efeito dos meios para o cultivo das diferentes espécies da família Orchidaceae, pode-se inferir que cada genótipo responde de maneira diferente. Dessa forma, além da formulação do meio de cultivo, deve-se considerar também o *status* nutricional e hormonal endógeno de cada material de estudo, ressaltando a necessidade de estudos específicos em relação ao genótipo de interesse (SOARES et al., 2013). Vale ressaltar que o número de plântulas no frasco não foi o fator decisivo para as respostas em termos de crescimento, uma vez que, embora adicionando somente 3 plântulas de *C. walkeriana* no frasco, a necessidade de suplementação foi a mesma observada para a espécie *C. nobilior* e a espécie *S. crispa* as quais foram avaliadas com 6 plântulas por frasco e a adição de polpa de banana foi suficiente. Assim, essa observação reforça a ideia de que o genótipo é decisivo nas necessidades nutricionais.

A adição dos suplementos orgânicos ao meio têm favorecido o cultivo de orquídeas nativas. Esse resultado está associado ao fato de que cada um dos materiais adicionados apresentam características importantes ao desenvolvimento das espécies em estudo. A polpa de banana é uma fonte rica em vitaminas, potássio e reguladores de crescimento como citocininas, auxinas e giberelinas (DOLCE et al., 2020). Além disso,

a adição desse material ao meio, usando sistema de vedação que permite trocas gasosas pode influenciar positivamente no cultivo *in vitro* de diferentes espécies de orquídeas (FREITAS et al., 2021). Já a água de coco, apresenta alto teor de glicose, frutose e sais minerais, além de reguladores de crescimento que favorecem o crescimento e desenvolvimento de plantas, como por exemplo, a citocinina e a zeatina (NUNES et al., 2008).

Freitas et al. (2021), estudando meios alternativos e sistema de vedação no cultivo *in vitro* de *Cattleya nobilior* Rchb.f., verificaram que a adição de polpa de banana na formulação dos meios de cultivo promoveu, de modo geral, o crescimento da planta, enquanto que a utilização do sistema de ventilação natural teve efeito positivo para comprimento de folha, diâmetro de pseudobulbo e altura das plantas. Por outro lado, Machado e Zamarian (2020), estudando diferentes meios no crescimento *in vitro* da espécie *Lycaste sp.*, verificaram que a adição de água de coco ao meio de cultivo MS influenciou no crescimento dos explantes.

Diante disso, os resultados obtidos neste trabalho permitem inferir que, as diferentes composições do meio nutritivo influenciaram no crescimento e desenvolvimento de *C. nobilior*, *C. walkeriana* e *S. crispa*, sendo que cada espécie estudada apresenta respostas diferentes de acordo com o meio utilizado, como pode ser visualizado na Figura 1.

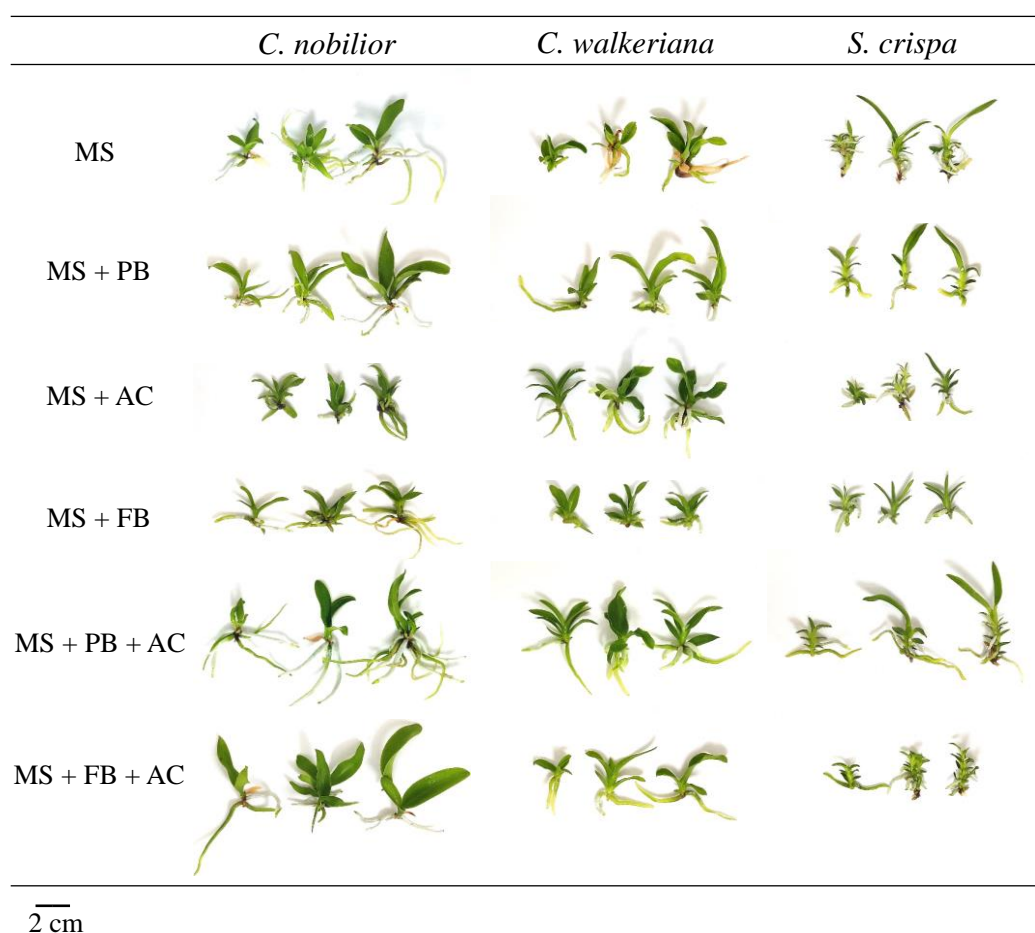


FIGURA 1. Plantas de *Cattleya nobilior* Rchb.f., *Cattleya walkeriana* Gardner e *Schomburgkia crispa* Lindl., em função de diferentes meios de cultivo (MS; MS + polpa de banana (PB); MS + água de coco (AC); MS + farinha de banana (FB); MS + PB + AC e MS + FB + AC) após 180 dias de cultivo *in vitro*. Dourados – MS, UFGD, 2021.

Crescimento *ex vitro*

Após 180 dias de aclimatização das plantas, a análise de variância demonstrou efeito significativo entre os meios de cultivo para todas as características avaliadas, em todas as espécies estudadas (Quadro 7).

QUADRO 7. Resumo da análise de variância da porcentagem de sobrevivência (%SOB), número de folhas (NF), comprimento da maior folha (CF), número de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CR), altura de planta (AP), diâmetro do pseudobulbo (DP), número de brotações (NB) e massa fresca (MF) de *Cattleya nobilior* Rchb.f., *Cattleya walkeriana* Gardner e *Schomburgkia crispa* Lindl., em função do prévio cultivo em diferentes meios, após 180 dias de cultivo *ex vitro*. Dourados – MS, UFGD, 2021.

| <i>Cattleya nobilior</i> Rchb.f. | | | | | | | | | | |
|------------------------------------|----|----------------|----------|------------|---------|-----------|----------|-----------|-----------|-----------|
| FV | GL | Quadrado médio | | | | | | | | |
| | | %SOB | NF | CF | NR | CR | AP | DP | NB | MF |
| Meio | 5 | 5569,28** | 127,72** | 848,43** | 27,50** | 2564,92** | 0,97** | 2689,25** | 1333,33** | 1054,83** |
| Erro | 24 | 0,14 | 1,11 | 34,55 | 0,10 | 17,19 | 0,00 | 33,93 | 3,25 | 10,60 |
| Média | | 38,21 | 2,06 | 13,05 | 1,50 | 11,82 | 0,18 | 33,19 | 6,66 | 15,42 |
| C.V. (%) | | 0,78 | 9,91 | 17,56 | 4,84 | 10,70 | 0,82 | 8,86 | 7,57 | 9,31 |
| <i>Cattleya walkeriana</i> Gardner | | | | | | | | | | |
| FV | GL | Quadrado médio | | | | | | | | |
| | | %SOB | NF | CF | NR | CR | AP | DP | NB | MF |
| Meio | 5 | 2479,20** | 5,20** | 1863,93** | 9,26** | 0,00** | 0,19** | 0,77** | 37,02** | 38,66** |
| Erro | 24 | 0,13 | 0,13 | 29,63 | 0,74 | 0,00 | 0,06 | 0,15 | 1,52 | 0,94 |
| Média | | 9,09 | 0,41 | 7,88 | 0,55 | 0,01 | 0,08 | 0,16 | 1,11 | 1,13 |
| C.V. (%) | | 1,19 | 8,65 | 19,31 | 16,62 | 2,73 | 9,38 | 13,66 | 18,44 | 13,52 |
| <i>Schomburgkia crispa</i> Lindl. | | | | | | | | | | |
| FV | GL | Quadrado médio | | | | | | | | |
| | | %SOB | NF | CF | NR | CR | AP | NB | MF | |
| Meio | 5 | 2914,70** | 83,33** | 14658,09** | 83,33** | 1141,76** | 211,95** | 1333,33** | 55,62** | |
| Erro | 24 | 18,76 | 0,85 | 102,86 | 0,36 | 13,16 | 2,90 | 4,02 | 0,26 | |
| Média | | 24,49 | 1,66 | 50,98 | 1,66 | 13,62 | 5,09 | 6,66 | 1,36 | |
| C.V. (%) | | 8,34 | 10,13 | 9,88 | 6,38 | 12,06 | 16,12 | 8,45 | 6,32 | |

** : significativo pelo teste F à 1% de probabilidade.

F.V: fator de variação; GL: grau de liberdade.

Quanto a %SOB de plantas de *C. nobilior*, o melhor resultado foi observado quando as plantas foram previamente cultivadas em meio MS + PB + AC, proporcionando 100% de sobrevivência. Para NF e NR os maiores valores foram encontrados quando utilizou-se meio MS + PB (12,38 e 5,00%, respectivamente). Já para CF foi observado maior incremento nas plantas que vieram do cultivo *in vitro* em meio MS (34,63%). Em relação as variáveis AP e MF, a utilização do meio MS + AC no cultivo *in vitro* de *C. nobilior*, demonstrou maiores incrementos após a aclimatização (1,08 e 34,71%). Para CR e NB naquelas obtidas através do prévio cultivo em meio MS + FB + AC (57,55 e 40,00%). Para DP, a maior média foi encontrada quando utilizou-se o meio MS + PB (60,54%), porém não diferiu estatisticamente do meio MS (58,76%) (Quadro 8).

QUADRO 8. Porcentagem de sobrevivência (%SOB) e incrementos (%) de número de folhas (NF), comprimento da maior folha (CF), número de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CR), altura de planta (AP), diâmetro do pseudobulbo (DP), número de brotações (NB) e massa fresca (MF) de *Cattleya nobilior* Rchb.f., em função do prévio cultivo em diferentes meios (MS; MS + polpa de banana (PB); MS + água de coco (AC); MS + farinha de banana (FB); MS + PB + AC e MS + FB + AC) após 180 dias de cultivo *ex vitro*. Dourados – MS, UFGD, 2021.

| Meio | Características | | | | | | | | |
|--------------|-----------------|---------|---------|--------|---------|--------|---------|---------|---------|
| | %SOB | NF | CF | NR | CR | AP | DP | NB | MF |
| MS | 13,04 e | 0,00 b | 34,63 a | 0,00 c | 0,00 c | 0,00 b | 58,76 a | 0,00 b | 14,17 c |
| MS + PB | 47,22 b | 12,38 a | 7,96 c | 5,00 a | 0,00 c | 0,00 b | 60,54 a | 0,00 b | 29,68 b |
| MS + AC | 9,52 f | 0,00 b | 21,44 b | 0,00 c | 7,72 b | 1,08 a | 31,05 b | 0,00 b | 34,71 a |
| MS + FB | 35,71 c | 0,00 b | 2,22 d | 0,00 c | 5,67 b | 0,00 b | 0,00 d | 0,00 b | 0,00 d |
| MS + PB + AC | 100,00 a | 0,00 b | 0,08 d | 0,00c | 0,00 c | 0,00 b | 20,77 c | 0,00 b | 0,00 d |
| MS + FB + AC | 23,80 d | 0,00 b | 11,94 c | 4,00 b | 57,55 a | 0,00 b | 28,01 b | 40,00 a | 13,98 c |
| Média | 38,21 | 2,06 | 13,05 | 1,50 | 11,82 | 0,18 | 33,19 | 6,66 | 15,42 |
| C.V.(%) | 0,78 | 9,91 | 17,56 | 4,84 | 10,7 | 0,82 | 8,86 | 7,57 | 9,31 |

Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott à 5% de probabilidade.

Para a espécie *C. walkeriana*, o prévio cultivo em meio MS + AC promoveu os melhores resultados para todas as características avaliadas após a aclimatização das plantas (Quadro 9).

QUADRO 9. Porcentagem de sobrevivência (%SOB) e incrementos (%) de número de folhas (NF), comprimento da maior folha (CF), número de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CR), altura de planta (AP), diâmetro do pseudobulbo (DP), número de brotações (NB) e massa fresca (MF) de *Cattleya walkeriana* Gardner, em função do prévio cultivo em diferentes meios (MS; MS + polpa de banana (PB); MS + água de coco (AC); MS + farinha de banana (FB); MS + PB + AC e MS + FB + AC) após 180 dias de cultivo *ex vitro*. Dourados – MS, UFGD, 2021.

| Meio | Características | | | | | | | | |
|--------------|-----------------|--------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | %SOB | NF | CF | NR | CR | AP | DP | NB | MF |
| MS | 0,00 b | 0,00 b | 0,00 b | 0,00 b | 0,00 b | 0,00 b | 0,00 b | 0,00 b | 0,00 b |
| MS + PB | 0,00 b | 0,00 b | 0,00 b | 0,00 b | 0,00 b | 0,00 b | 0,00 b | 0,00 b | 0,00 b |
| MS + AC | 54,54 a | 2,50 a | 47,29 a | 3,33 a | 0,10 a | 0,48 a | 0,96 a | 6,66 a | 6,81 a |
| MS + FB | 0,00 b | 0,00 b | 0,00 b | 0,00 b | 0,00 b | 0,00 b | 0,00 b | 0,00 b | 0,00 b |
| MS + PB + AC | 0,00 b | 0,00 b | 0,00 b | 0,00 b | 0,00 b | 0,00 b | 0,00 b | 0,00 b | 0,00 b |
| MS + FB + AC | 0,00 b | 0,00 b | 0,00 b | 0,00 b | 0,00 b | 0,00 b | 0,00 b | 0,00 b | 0,00 b |
| Média | 9,09 | 0,41 | 7,88 | 0,55 | 0,01 | 0,08 | 0,16 | 1,11 | 1,13 |
| C.V.(%) | 1,19 | 8,65 | 19,31 | 16,62 | 2,73 | 9,38 | 13,66 | 18,44 | 13,52 |

Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott à 5% de probabilidade.

Em relação a espécie *S. crispa*, a maior %SOB foi observada quando as plantas foram previamente cultivadas em meio MS + PB (57,89%). Já em relação as demais variáveis avaliadas, os maiores valores de incremento foram encontrados quando as plantas foram cultivadas *in vitro* em meio MS + FB + AC (Quadro 10).

QUADRO 10. Porcentagem de sobrevivência (%SOB) e incrementos (%) de número de folhas (NF), comprimento da maior folha (CF), número de raízes (NR), comprimento da maior raiz (CR), altura de planta (AP), diâmetro do pseudobulbo (DP), número de brotações (NB) e massa fresca (MF) de *Schomburgkia crispa* Lindl., em função do prévio cultivo em diferentes meios (MS; MS + polpa de banana (PB); MS + água de coco (AC); MS + farinha de banana (FB); MS + PB + AC e MS + FB + AC) após 180 dias de cultivo *ex vitro*. Dourados – MS, UFGD, 2021.

| Meio | Características | | | | | | | |
|--------------|-----------------|---------|----------|---------|---------|---------|---------|--------|
| | %SOB | NF | CF | NR | CR | AP | NB | MF |
| MS | 6,66 d | 0,00 b | 17,57 c | 0,00 b | 18,74 b | 5,87 b | 0,00 b | 0,00 b |
| MS + PB | 57,89 a | 0,00 b | 5,74 d | 0,00 b | 0,00 d | 0,00 d | 0,00 b | 0,00 b |
| MS + AC | 23,06 c | 0,00 b | 70,82 b | 0,00 b | 17,54 b | 4,83 b | 0,00 b | 0,00 b |
| MS + FB | 0,00 e | 0,00 b | 0,00 d | 0,00 b | 0,00 d | 0,00 d | 0,00 b | 0,00 b |
| MS + PB + AC | 50,00 b | 0,00 b | 70,72 b | 0,00 b | 5,97 c | 2,40 c | 0,00 b | 0,00 b |
| MS + FB + AC | 9,37 d | 10,00 a | 141,05 a | 10,00 a | 39,51 a | 17,42 a | 40,00 a | 8,17 a |
| Média | 24,49 | 1,66 | 50,98 | 1,66 | 13,62 | 5,09 | 6,66 | 1,36 |
| C.V.(%) | 8,34 | 10,13 | 9,88 | 6,38 | 12,06 | 16,12 | 8,45 | 6,32 |

Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott à 5% de probabilidade.

Ao observar os resultados obtidos na fase de aclimatização, foi possível verificar que para as espécies *C. nobilior* e *S. crispa*, as plantas que apresentaram melhores resultados no prévio cultivo *in vitro* não elevaram sua taxa de crescimento quando foram transferidas para o ambiente *ex vitro*, isso pode ter ocorrido devido as plantas já terem iniciado seu processo de rustificação durante o cultivo *in vitro*. Esses resultados corroboram com os de Ribeiro et al. (2019), que relatam que as plantas de *Dendrobium bigibbum* Lindl. cultivadas em sistema de ventilação natural também iniciaram seu processo de rustificação durante o cultivo *in vitro*, devido à redução da umidade *in vitro* e aumento na aeração. Por outro lado, as plantas de *C. nobilior* e *S. crispa* que mais se desenvolveram na fase de aclimatização foram as previamente cultivadas em meio MS + PB e MS + FB + AC, respectivamente, as quais tiveram menor taxa de sobrevivência porém continuaram o seu desenvolvimento.

Já em relação a espécie *C. walkeriana*, as plantas previamente cultivadas em meio de cultivo suplementado com água de coco apresentaram maior crescimento na fase *ex*

vitro. Isso pode ser em decorrência do fato da água de coco ser um complexo nutritivo que contém citocinina que é um fitohormônio que estimula o crescimento de plantas (UTAMI et al., 2017). Por outro lado, as plantas dos demais tratamentos não sobreviveram mesmo naqueles contendo água de coco. Esse fato pode ser devido ao genótipo, e dessa forma sugere-se maiores estudos sobre o efeito da água de coco no cultivo *in vitro* dessa espécie, que possivelmente proporcionou sua rustificação *in vitro* e sobrevivência *ex vitro*.

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, dentre todos os meios de cultivo utilizados, os que apresentaram maior influência no desenvolvimento das plantas durante a fase de aclimatização foram os meios alternativos, possivelmente pela maior disponibilidade de nutrientes quando comparados com a formulação do meio de cultivo convencional. Essas respostas podem ser verificadas visualmente na Figura 2.

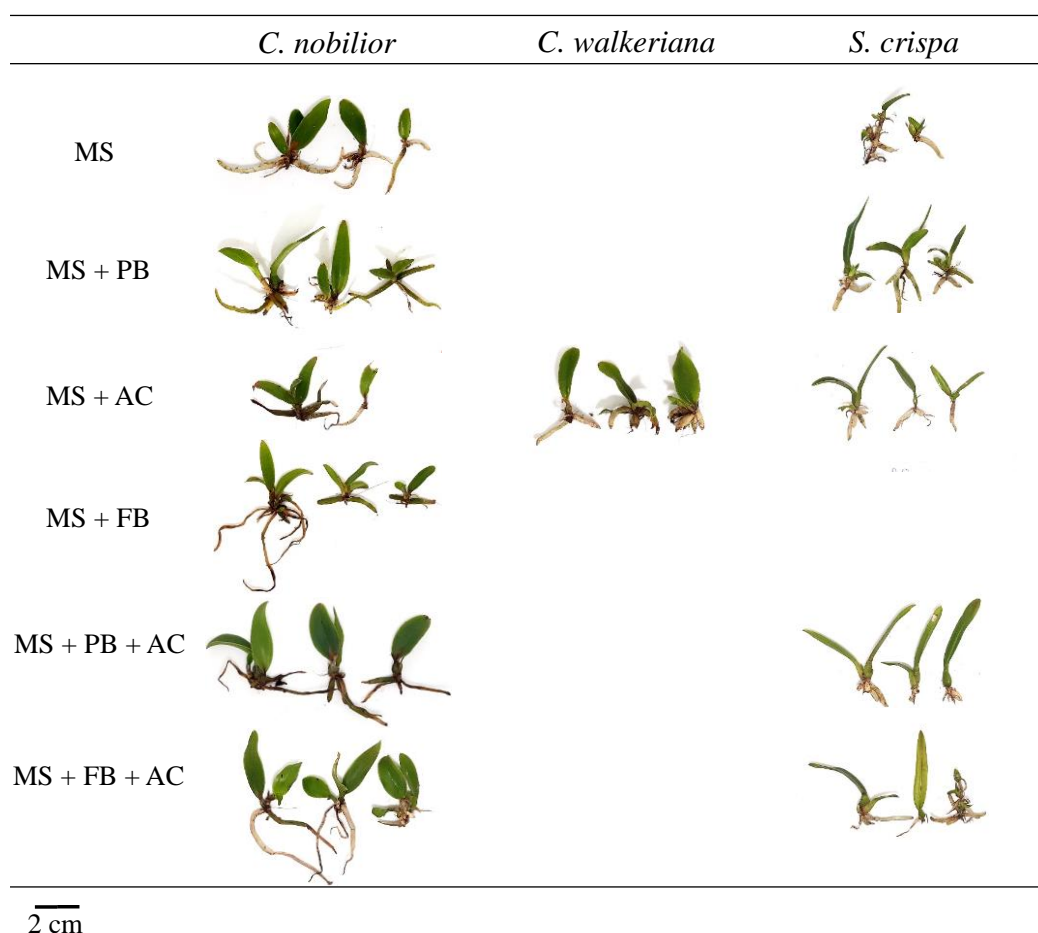


FIGURA 2. Plantas de *Cattleya nobilior*, *Cattleya walkeriana* e *Schomburgkia crispa*, após 180 dias de aclimatização em função do prévio cultivo *in vitro* em diferentes meios (MS; MS + polpa de banana (PB); MS + água de coco (AC); MS + farinha de banana (FB); MS + PB + AC e MS + FB + AC) Dourados – MS, UFGD, 2021.

CONCLUSÃO

Para *C. nobilior*, a utilização do meio de cultivo MS + PB + AC é recomendada para o crescimento *in vitro*, assim como para o estabelecimento *ex vitro* das mudas.

Para *C. walkeriana*, recomenda-se o cultivo em meio MS + AC para o crescimento *in vitro* e estabelecimento *ex vitro*.

Para *S. crispa*, o cultivo *in vitro* em meio MS + PB favoreceu tanto o crescimento *in vitro* quanto a aclimatização das plantas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, A. G.; PASQUAL, M.; VILLA, F.; COSTA, F. C. Água de coco e polpa de banana no cultivo *in vitro* de plântulas de orquídea. **Revista Ceres**, v. 53, p. 608-613, 2006.
- BARROS, F.; HALL, C. F.; DE PAIVA NETO, V. B.; BATISTA, J. A. N. Check-list das Orchidaceae do estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Iheringia. Série Botânica**, v. 73, p. 287-296, 2018.
- CARDOSO, J. C. Publicação em cultivo *in vitro* de plantas: qualidade para o avanço científico e tecnológico. **Horticultura Brasileira**, v. 32, p. 383-384, 2014.
- CARDOSO, M. C. **Estabelecimento *in vitro* sob condições mixotróficas e criopreservação de *Hancornia speciosa* Gomes**. 2015. 78f. Dissertação (Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
- CARNEIRO, L. L. **Pré-Melhoramento genético, floração *in vitro* e criopreservação de orquídeas nativas do cerrado**. 2014. 88f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento Plantas) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
- CNCFlora. ***Cattleya nobilior* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2**. Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em: <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/ptbr/profile/Cattleya nobilior](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/ptbr/profile/Cattleya_nobilior)>. Acesso em: 19 outubro 2020.
- DOLCE, N. R.; MEDINA, R. D.; TERADA, G.; GONZÁLEZ-ARNAO, M. T.; FLACHSLAND, E. A. *In Vitro* Propagation and Germplasm Conservation of Wild Orchids from South America. **Orchid Biology: Recent Trends & Challenges**, p. 37-94, 2020.
- FLORA DO BRASIL 2020 EM CONSTRUÇÃO. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB179>>. Acesso em: 10 fev. 2021.
- FREITAS, K. G.; SORGATO, J. C.; SOARES, J. S.; RIBEIRO, L. M. *In vitro* growth of *Cattleya nobilior* Rchb. f.: culture media, sealing systems and irradiance. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 51, p. e67131-e67131, 2021.
- GARAY, L. A. On the origin of the Orchidaceae II. **Journal of the Arnold Arboretum**, v. 53, p. 202-215, 1972.
- HANUS-FAJERSKA, E.; WOJCIECHOWSKA, R. Impact of Light-Emitting Diodes (LEDs) on propagation of orchids in tissue culture. In: **Light emitting diodes for agriculture**. Springer, Singapore, p. 305-320, 2017.
- LAZZARINI, L. E. S.; PACHECO, F. V.; SILVA, S. T.; COELHO, A. D.; MEDEIROS, A. P. R.; BERTOLUCCI, S. K. V.; SOARES, J. D. R. Use of light-emitting diode (LED)

in the physiology of cultivated plants—review. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 16, p. 137-144, 2017.

MACHADO, W.; ZAMARIAN, A. S. Polpa de Banana, Água de Coco e Carvão Ativado no Desenvolvimento *in vitro* de *Lycaste* sp. **Ensaio e Ciência C Biológicas Agrárias e da Saúde**, v. 24, p. 159-163, 2020.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiology plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

NUNES, C. F.; PASQUAL, M.; SANTOS, D. N. D.; CUSTÓDIO, T. N.; ARAUJO, A. G. D. Diferentes suplementos no cultivo *in vitro* de embriões de pinhão-manso. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p. 9-14, 2008.

OSTETTO, S. **Orquídeas de Mato Grosso do Sul**. Campo Grande: Alvorada, p. 141, 2015.

RIBEIRO, L. M.; SORGATO, J. C.; SCALON, S. D. P. Q.; SOARES, J. S.; RIBEIRO, I. S. Influência da luz, ventilação natural e tamanho do frasco no crescimento e desenvolvimento de denphal (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias (Agrária)**, v. 14, p. 5957, 2019.

RIBEIRO, L. M.; SORGATO, J. C.; SOARES, J. S.; RAMOS, J. C. M. Methodology of the tetrazolium test for identifying viable seeds of orchids of the genus *Cattleya* native to the Brazilian Cerrado. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 42, p. 1351-1360, 2021.

SILVA, A. B.; REIS, C. O.; CAZETTA, J. O.; CARLIN, S. D.; LANDGRAF, P. R. C.; REIS, M. C. Effects of exogenous proline and a natural ventilation system on the *in vitro* growth of orchids. **Bioscience Journal**, v. 32, p. 619-626, 2016.

SILVA, D. L. V.; ALVES, R. E.; FIGUEIREDO, R. W.; MACIEL, V. T.; FARIS, J. M.; AQUINO, A. R. L. Características físicas, físico-químicas e sensoriais da água de frutos de coqueiro anão verde oriundo de produção convencional e orgânica. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, p. 1079-1084, 2009.

SILVA, E. F.; VILLA, F.; PASQUAL, M. Meio de cultura knudson modificado utilizado no cultivo *in vitro* de um híbrido de orquídea. **Scientia Agraria**, v. 10, p. 267-274, 2009.

SOARES, J. S.; ROSA, Y. B.; SUZUKI, R. M.; SCALON, S. P.; ROSA JUNIOR, E. J. *In vitro* cultivation of *Dendrobium nobile* using coconut water in the culture medium. **Horticultura Brasileira**, v. 31, p. 63-67, 2013.

SOARES, J. S.; SORGATO, J. C.; RIBEIRO, L. M. Protocolo para germinação assimbiótica e desenvolvimento inicial de protocormos de orquídeas nativas do Cerrado brasileiro. **Rodriguésia**, v. 71, 2020.

SOARES, J. S.; SORGATO, J. C.; RIBEIRO, L. M.; RAMOS, J. M. C. Seed viability test of orchids native to the Brazilian Savanna. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 51, p. e67069-e67069, 2021.

SORGATO, J. C.; LEMES, C. S. R.; RAMOS, W. B.; SOARES, J. S.; ROSA, Y. B. C. J. Ácido naftalenoacético no enraizamento *in vitro* de *Dendrobium phalaenopsis* Fitzgerald. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, p. 72-79, 2014.

SORGATO, J. C.; MUDOLON, E. D.; GUIMARÃES, F. F.; SOARES, J. S.; RIBEIRO, L. M. Light sources on the germination and initial *in vitro* establishment of *Schomburgkia crispa* Lindl., a species of the Brazilian Cerrado. **Ciência Rural**, v. 51, n. 3, 2021.

SU, M. J.; SCHNITZER, J. A.; FARIA, R. T. Polpa de banana e fertilizantes comerciais no cultivo *in vitro* de orquídea. **Científica**, v. 40, p. 28-34, 2012.

UTAMI, E. S. W.; HARIYANTO, S.; MANUHARA, Y. S. W. *In vitro* propagation of the endangered medicinal orchid, *Dendrobium lasianthera* JJ Sm through mature seed culture. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, p. 406-410, 2017.

VIRŠILĖ, A.; OLLE, M.; DUCHOVSKIS, P. LED lighting in horticulture. In: **Light emitting diodes for agriculture**. Springer, Singapore, p. 113-147, 2017.

VUDALA, S. M.; RIBAS, L. L. F. Seed storage and asymbiotic germination of *Hadrolaelia grandis* (Orchidaceae). **South African Journal of Botany**, v. 108, p. 1-7, 2017.

CAPÍTULO II - SISTEMAS DE MICROPROPAGAÇÃO E ACLIMATIZAÇÃO DE *Cattleya nobilior* Rchb.f.

RESUMO

O gênero *Cattleya* é um dos mais cultivados e comercializados do país, sendo necessário otimizar os protocolos de propagação existentes para superar as limitações da conservação *in situ* dessas espécies. Objetivou-se avaliar o crescimento inicial *in vitro*, assim como o estabelecimento *ex vitro* de *Cattleya nobilior* Rchb.f. a partir de plantas cultivadas *in vitro* em diferentes sistemas de micropropagação e meios de cultivo. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado e os tratamentos arranjados em esquema fatorial 2 x 4 com cinco repetições de cinco plantas cada. Foi realizada a sementeira assimiótica, utilizando-se meio MS^{1/2}. Após 180 dias de sementeira, as plântulas foram transferidas para os seguintes meios de cultivo: 1- MS; 2- MS + polpa de banana (PB); 3- MS + água de coco (AC) ou 4- MS + PB + AC, em seguida alocados em dois sistemas de micropropagação: 1- sistema convencional (SC) ou 2- biorreator de imersão temporária (BIT), sendo 25 plantas por meio de cultivo em cada sistema de micropropagação. Plantas cultivadas *in vitro* por 180 dias, a partir do período experimental, foram retiradas dos frascos, lavadas e avaliadas quanto ao número de folhas, número de raízes, comprimento da maior folha, comprimento da maior raiz, altura de planta, diâmetro do pseudobulbo, número de brotações e massa fresca total. A seguir foram plantadas em recipientes contendo substrato em forma de mix (esfagno rosa + fibra de coco) e transferidas para o ambiente *ex vitro*. Com intuito de investigar a hipótese de aumento no crescimento das plantas durante a fase *ex vitro*, após 180 dias, as plantas foram avaliadas quanto à sobrevivência e às mesmas características iniciais. Para o crescimento *in vitro* e estabelecimento *ex vitro* de *C. nobilior*, recomenda-se o cultivo *in vitro* em BIT, utilizando-se o meio MS + PB.

Palavras-chave: Orchidaceae, Biorreator, Meio de cultivo

MICROPROPAGATION AND ACLIMATIZATION SYSTEMS OF *Cattleya nobilior* Rchb.f.

ABSTRACT

The *Cattleya* genus is one of the most cultivated and commercialized in the country, and it is necessary to optimize the existing propagation protocols to overcome the limitations of in situ conservation of these species. The objective was to evaluate the initial growth *in vitro*, as well as the *ex vitro* establishment of *Cattleya nobilior* Rchb.f. from plants cultivated *in vitro* in different micropropagation systems and culture medium. The experimental design used was completely randomized and the treatments arranged in a 2 x 4 factorial scheme with five replications of five plants each. Asymbiotic seeding was carried out, using MS^{1/2} medium. After 180 days of sowing, the seedlings were transferred to the following culture media: 1) MS; 2) MS + banana pulp (PB); 3) MS + coconut water (AC); 4) MS + PB + AC, then allocated to two micropropagation systems: 1) conventional system (SC); 2) temporary immersion bioreactor (BIT), with 25 plants growing in each micropropagation system. Plants cultivated *in vitro* for 180 days from the experimental period were removed from the flasks, washed and evaluated for the number of leaves, number of roots, length of longest leaf, length of longest root, plant height, pseudobulb diameter, number of shoots and total fresh mass. Then they were planted in containers containing substrate in the form of a mix (pink sphagnum + coconut fiber) and transferred to the *ex vitro* environment. In order to investigate the hypothesis of increased plant growth during the *ex vitro* phase, after 180 days, the plants were evaluated for survival and the same initial characteristics. For the *in vitro* growth and *ex vitro* establishment of *C. nobilior*, *in vitro* culture in BIT using MS + PB medium is recommended.

Keywords: Orchidaceae, Bioreactor, Culture medium.

INTRODUÇÃO

A família Orchidaceae originou-se na Malásia, é considerada uma das duas maiores e mais diversificadas famílias dentre as Angiospermas (CHASE et al., 2015), destacam-se devido à beleza de suas flores, diversidade de cores e formas (JORGE et al., 2015). No Brasil, são encontradas cerca de 2692 espécies de orquídeas, sendo que 1490 são endêmicas (FLORA DO BRASIL EM CONSTRUÇÃO, 2021).

Entre os gêneros mais comercializados no Brasil está *Cattleya*, juntamente com outras orquídeas como *Phalaenopsis* e *Dendrobium*. Possui cerca de 48 espécies distribuídas por toda América Tropical, região caracterizada por habitats luminosos e alta umidade relativa (aproximadamente 88%). Suas flores são diversificadas quanto ao tamanho e apresentam inúmeras cores (FARIA, et al., 2010; CARDOSO, 2014; JUNQUEIRA e PEETZ, 2017).

Dentre as espécies desse gênero, destaca-se a *Cattleya nobilior* Rchb.f., que é uma planta epífita com elevada importância econômica, devido às características ornamentais, tais como flores grandes, vistosas e de coloração róseo-lilás (RODRIGUEZ et al., 2009; SCHNEIDERS et al., 2012). Por essas características, somadas às ameaças iminentes ao habitat e às coletas indiscriminadas, essa espécie pode ser levada a uma categoria de ameaça em um futuro próximo, sendo desta forma classificada como quase ameaçada (CNCFlora, 2012). Assim, o cultivo *in vitro* pode ser uma alternativa tanto para a produção comercial de mudas, quanto para a conservação da espécie.

Neste contexto, diferentes sistemas de cultivo podem ser desenvolvidos visando obter melhorias no processo de produção de mudas *in vitro*. O cultivo convencional ainda é o mais utilizado, mas possui algumas limitações quanto ao seu uso comercial. Sendo assim, o uso de técnicas de cultivo de plantas utilizando equipamentos semi-automatizados, como biorreatores, são indicados como uma alternativa viável para o processo de otimização e redução de custos na produção, devido a diminuição de contaminação e mão de obra (BALOGUN et al., 2014; REIS et al., 2018).

Entre os equipamentos utilizados na propagação comercial de plantas, os biorreatores de imersão temporária são os que mais se destacam para a produção de orquídeas, uma vez que facilitam o controle de parâmetros físicos que podem promover o crescimento de plantas (MURTHY et al., 2018), além de manter o contato temporário

das plantas com o meio onde são cultivadas, o que possibilita absorção de nutrientes por toda a superfície do material vegetal (BONILLA et al., 2020).

Além disso, para o sucesso na utilização dessas ferramentas biotecnológicas, deve-se considerar também a composição do meio nutritivo, que é responsável por oferecer todos os macros e micronutrientes necessários para o desenvolvimento de uma cultura quando propagada *in vitro*. Dentre os meios mais utilizados no cultivo *in vitro* de espécies de orquídeas, destaca-se o meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), podendo apresentar mudanças em sua formulação para atender às exigências de cada espécie (TEIXEIRA DA SILVA et al., 2015). Freitas et al. (2014) estudando diferentes meios de cultivo para a propagação *in vitro* de *Cattleya intermedia* Graham, verificaram que o meio Knudson C (KNUDSON, 1946) acrescido de banana (150 g) favoreceu o incremento de massa fresca das plantas, sendo esse o meio mais indicado para o cultivo da espécie estudada. Já Utami et al. (2017) verificaram que a suplementação do meio VW (VACIN WENT, 1949) com 15% de água de coco teve efeito positivo para o aumento do número de folhas e raízes, além da altura de plantas de *Dendrobium lasianthera*. J.J.Sm.

O êxito desse tipo de propagação também depende da adaptação das mudas durante a fase *ex vitro*, sendo esse um dos maiores obstáculos para a produção comercial (SOUSA et al., 2015). A aclimatização é uma fase importante na micropropagação, definida como a adaptação de um organismo que é transferido para um novo ambiente (FARIA et al., 2012). Esta fase é uma etapa importante nos protocolos de multiplicação, uma vez que as plantas micropropagadas podem não sobreviver à transferência para condições heterotróficas (LEMES, 2015; MENGARDA et al., 2017).

Com intuito de verificar a hipótese de que a utilização de biorreatores e a suplementação do meio com banana e água de coco influenciem positivamente no cultivo *in vitro* e na aclimatização da espécie estudada, objetivou-se avaliar o crescimento *in vitro*, assim como o estabelecimento *ex vitro* de *C. nobilior* a partir de plantas cultivadas *in vitro* em diferentes sistemas de micropropagação e meio de cultivo.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cultivo *in vitro* de Flores e Plantas Ornamentais e no Centro de Biotecnologia e Melhoramento Genético da Cana-de-Açúcar (CBMGCA), da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA), da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD).

Como material de estudo, foram utilizados frutos maduros de *Cattleya nobilior* Rchb.f., oriundos da polinização manual provenientes de matrizes com mais de dez anos, cultivadas em viveiro coberto pela sobreposição de duas telas de sombreamento de 50%, propiciando irradiância de $235 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sob condições médias de temperatura e umidade relativa de $22,6 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ e $73,9 \pm 10\%$, respectivamente, com irrigação realizada por microaspersores tipo bailarina, posicionados a um metro acima das plantas, totalizando uma lâmina de água de 1 mm dia^{-1} .

Foi pesada uma amostra de 0,005 g de sementes e realizado teste de tetrazólio segundo metodologia de Ribeiro et al. (2021). Após a confirmação da viabilidade, outra amostra de 0,005g de sementes foi levada para ambiente asséptico e desinfestada conforme metodologia descrita por Soares et al. (2020), para a obtenção da solução de sementes. Para a semeadura *in vitro*, inoculou-se 1,0 mL da suspensão de sementes desinfestadas por frasco de cultivo. Foram utilizados 60 mL de meio de cultivo Murashige & Skoog (1962), na metade da concentração de sais ($\text{MS}^{1/2}$) por frasco com capacidade para 600 mL. Posteriormente, as culturas foram acondicionadas em sala de crescimento com temperatura e fotoperíodo controlados ($25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$; 16 h) e irradiância de $22 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ propiciada por duas lâmpadas fluorescentes brancas. Permanecendo nessas condições por 180 dias, sendo subcultivadas por uma vez.

Para o início do período experimental, as plantas com 180 dias após a semeadura *in vitro*, foram padronizadas quanto ao tamanho ($1,5 \pm 0,3 \text{ cm}$) e na sequência transferidas, em ambiente asséptico, para os seguintes meios de cultivo: 1) MS; 2) MS + polpa de banana (PB) (100 g L^{-1} de polpa de banana maça); 3) MS + água de coco (AC) (100 mL L^{-1}); 4) MS + PB (100 g L^{-1}) + AC (100 mL L^{-1}), sendo em seguida alocados em dois sistemas de micropropagação: 1) sistema convencional (SC); 2) biorreator de imersão temporária (BIT).

No cultivo convencional em cada frasco foram utilizados 60 mL dos meios solidificados com $6,0 \text{ g L}^{-1}$ de ágar bacteriológico (Himedia®, Índia) e acrescido de 30 g

L⁻¹ de sacarose. Para o biorreator foram utilizados 200 mL dos mesmos meios, porém sem agente geleificante, sendo o mesmo programado com ciclos de aeração de 3 minutos a cada 5 horas e 57 minutos. O pH de todos os meios foi ajustado para 5,8 antes da esterilização em autoclave, que foi realizada a 121 °C e 1,1 atm de pressão por 20 minutos. O material inoculado (25 plantas por meio de cultivo em cada sistema de micropropagação) foi acondicionado em fotoperíodo, temperatura e irradiância controladas (16 horas; 25±2 °C; 18,9 μmol m⁻²s⁻¹) e sob a seguinte condição de luz: LED 50% branco (6500K) + 25% azul + 25% vermelho. Permanecendo nessas condições por 180 dias.

Decorrido este período, as plantas foram retiradas dos frascos, lavadas em água corrente até total remoção do meio de cultivo e avaliadas quanto ao número de folhas (NF), número de raízes (NR), número de brotações (NB), comprimento da maior folha (CF) (mm), comprimento da maior raiz (CR) (mm), altura de planta (AP) (mm), diâmetro do pseudobulbo (DP) (mm), e massa fresca (MF) (g). Após as avaliações, os tratamentos foram fotografados com câmera acoplada em mini estúdio fotográfico.

Na sequência, as plantas foram transferidas para recipientes de polipropileno transparente com capacidade para 1000 mL (20 x 10 x 5 cm), providos de furos na base e tampa, para drenagem do substrato e trocas gasosas, respectivamente. Os recipientes foram preenchidos com substrato, sendo 1/3 de seu volume preenchido com esfagno rosa (Agrolink, Holambra-SP) + fibra de coco (Golden-Mix Chips, Amafibra) (1:2, v:v). Após o plantio, os recipientes foram alocados em viveiro telado sob as mesmas condições das plantas matrizes. Esses recipientes permaneceram tampados pelos primeiros 15 dias de aclimatização (pré-aclimatização), para minimizar os efeitos iniciais da transferência do ambiente *in vitro* para o *ex vitro*, sendo abertos em seguida.

Após 180 dias de aclimatização, foram avaliadas quanto à sobrevivência e as mesmas características iniciais (NF, NR, NB, CF, CR, AP, DP e MF). Com intuito de investigar a hipótese de aumento no crescimento das plantas durante a fase *ex vitro*, de acordo com os tratamentos a que foram expostas na fase *in vitro*, foram calculados seus incrementos (I) em relação aos valores iniciais, por meio da expressão proposta por Ribeiro et al. (2019), $I = (VF - VI)$, onde VI é o valor da variável antes da planta ser aclimatizada e VF é o valor da mesma variável após o período *ex vitro*, sendo seus valores expressos em porcentagem e submetidos à análise de variância.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e os tratamentos foram arranjos em esquema fatorial 2 x 4 (dois sistemas de micropropagação e quatro meios

de cultivo com cinco repetições de cinco plantas cada. Os resultados foram transformados para $\sqrt{(x+1)}$ e, a seguir, submetidos à análise de variância. Para verificar as diferenças entre os sistemas de micropropagação, as médias foram comparadas pelo teste t de Bonferroni, e para verificar as diferenças entre os meios de cultivo empregou-se o teste de Tukey à 5% de probabilidade, respectivamente. Foi utilizado o programa SISVAR (Programa de Análises Estatísticas v.5.3. Universidade Federal de Lavras, MG).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Crescimento *in vitro*

A análise de variância revelou que para todas as características estudadas em plantas de *Cattleya nobilior* houve efeito significativo para interação entre os meios de cultivo e os sistemas de micropropagação (Quadro 1).

QUADRO 1. Resumo da análise de variância de número de folhas (NF), número de raízes (NR), número de brotações (NB), comprimento da maior folha (CF), comprimento da maior raiz (CR), altura de planta (AP), diâmetro do pseudobulbo (DP), e massa fresca (MF) de *Cattleya nobilior* Rchb.f., em função de diferentes meios e sistemas de micropropagação após 180 dias de cultivo *in vitro*. Dourados – MS, UFGD, 2021.

| FV | GL | Quadrado médio | | | | | | | |
|----------|----|----------------|---------|--------|---------|----------------------|----------|--------------------|-------|
| | | NF | NR | NB | CF | CR | AP | DP | MF |
| S | 1 | 2018,60* | 184,71* | 86,65* | 609,00* | 195,75 ^{ns} | 1363,02* | 0,94* | 0,43* |
| M | 3 | 1381,80* | 179,35* | 63,80* | 238,00* | 1468,07* | 2819,09* | 0,43 ^{ns} | 1,33* |
| S x M | 3 | 807,38* | 285,14* | 45,93* | 297,88* | 993,29* | 1952,70* | 1,10* | 1,10* |
| Erro | 32 | 84,10 | 20,23 | 6,05 | 24,16 | 105,08 | 262,30 | 0,22 | 0,05 |
| Média | | 14,90 | 10,42 | 3,40 | 18,66 | 43,94 | 70,87 | 1,79 | 0,99 |
| C.V. (%) | | 22,47 | 19,74 | 19,79 | 18,48 | 18,23 | 19,02 | 9,92 | 6,40 |

*: significativo a 5% de probabilidade; ns: não significativo pelo teste de F.

GL.: grau de liberdade. F.V: fator de variação. S: sistemas de micropropagação. M: meio de cultivo.

Para as características de NF, NR e NB, a interação S x M demonstrou que os maiores valores foram encontrados no sistema de cultivo convencional em conjunto com o meio MS (52,40; 26,40; 11,80, respectivamente), enquanto em BIT independe do meio de cultivo (Quadro 2).

QUADRO 2. Número de folhas (NF), número de raízes (NR) e número de brotações (NB) de *Cattleya nobilior* Rchb.f. em função do meio de cultivo (MS; MS + polpa de banana (PB); MS + água de coco (AC); MS + PB + AC) e do sistema de micropropagação (SC= sistema convencional; BIT= biorreator de imersão temporária) após 180 dias de cultivo *in vitro*. Dourados – MS, UFGD, 2021.

| Meio | NF | | NR | | NB | |
|--------------|----------|----------|----------|----------|----------|---------|
| | SC | BIT | SC | BIT | SC | BIT |
| MS | 52,40 Aa | 11,40 Ba | 26,40 Aa | 6,40 Ba | 11,80 Aa | 2,40 Ba |
| MS + PB | 7,60 Ab | 7,60 Aa | 7,00 Ab | 9,40 Aa | 2,00 Ab | 2,00 Aa |
| MS + AC | 18,20 Ab | 9,00 Aa | 8,80 Ab | 11,80 Aa | 3,40 Ab | 2,40 Aa |
| MS + PB + AC | 8,50 Ab | 5,16 Aa | 7,50 Ab | 6,33 Aa | 2,00 Ab | 1,33 Aa |
| Média | 21,67 | 8,29 | 12,42 | 8,48 | 4,80 | 2,03 |
| C.V.(%) | 22,47 | | 19,74 | | 19,79 | |

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste t de Bonferroni ($p \geq 0,05$) e médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$) dentro das variáveis.

Plantas cultivadas em sistema de cultivo convencional em meio MS tiveram maiores valores para NF, NR e NB, o que promoveu o perfilhamento das plantas quando cultivadas nessas condições. Segundo os autores Martins et al. (2015) e Teixeira da Silva et al. (2017), as plantas cultivadas em frascos com vedação hermética podem apresentar desordens fisiológicas e alterações no desenvolvimento dos tecidos, já que esse sistema de cultivo impede as trocas gasosas entre o microambiente dentro do frasco e o ar atmosférico, resultando no aumento de CO₂ e do gás etileno, o que, nesse trabalho fez com que as plantas perfilhassem.

Quanto ao CF, as maiores médias foram observadas quando as plantas foram cultivadas em biorreator de imersão temporária com meio de cultivo MS + PB, acarretando folhas de 36,22 mm. Os maiores valores de CR foram obtidas nas plantas cultivadas em biorreator com o meio MS, não diferindo estatisticamente daquelas em meio MS + PB (65,30; 57,55 mm, respectivamente) (Quadro 3).

QUADRO 3. Comprimento da maior folha (CF) e comprimento da maior raiz (CR), de *Cattleya nobilior* Rchb.f., em função do meio de cultivo (MS; MS + polpa de banana (PB); MS + água de coco (AC); MS + PB + AC) e do sistema de micropropagação (SC= sistema convencional; BIT= biorreator de imersão temporária) após 180 dias de cultivo *in vitro*. Dourados – MS, UFGD, 2021.

| Meio | CF (mm) | | CR (mm) | |
|--------------|----------|----------|----------|----------|
| | SC | BIT | SC | BIT |
| MS | 13,04 Ba | 20,62 Ab | 30,95 Bb | 65,30 Aa |
| MS + PB | 15,65 Ba | 36,22 Aa | 58,84 Aa | 57,55 Aa |
| MS + AC | 11,56 Ba | 21,12 Ab | 39,95 Ab | 39,49 Ab |
| MS + PB + AC | 18,84 Aa | 13,34 Ab | 35,50 Ab | 25,88 Ab |
| Média | 14,77 | 22,82 | 41,31 | 47,05 |
| C.V. (%) | 18,48 | | 18,23 | |

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste t de Bonferroni ($p \geq 0,05$) e médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$) dentro das variáveis.

Por outro lado, quando foi utilizado o sistema de cultivo convencional em conjunto com o meio MS, foram obtidos os maiores valores de massa fresca (1,78 g) (Quadro 4). Esse resultado está associado ao fato de nessas mesmas condições as plantas terem apresentado maiores valores de NF, NR e NB que foram encontrados no mesmo tratamento.

QUADRO 4. Altura de planta (AP), diâmetro do pseudobulbo (DP) e massa fresca (MF) de *Cattleya nobilior* Rchb.f., em função do meio de cultivo (MS; MS + polpa de banana (PB); MS + água de coco (AC); MS + PB + AC) e do sistema de micropropagação (SC= sistema convencional; BIT= biorreator de imersão temporária) após 180 dias de cultivo *in vitro*. Dourados – MS, UFGD, 2021.

| Meio | AP (mm) | | DP (mm) | | MF (g) | |
|--------------|----------|-----------|---------|---------|---------|---------|
| | SC | BIT | SC | BIT | SC | BIT |
| MS | 52,60 Ba | 94,27 Aab | 1,97 Aa | 1,39 Ab | 1,78 Aa | 0,73 Bb |
| MS + PB | 79,64 Ba | 105,67 Aa | 1,72 Ba | 2,44 Aa | 1,06 Bb | 1,63 Aa |
| MS + AC | 61,30 Aa | 67,82 Abc | 2,11 Aa | 1,46 Bb | 0,73 Ab | 0,80 Ab |
| MS + PB + AC | 65,57 Aa | 44,36 Ac | 2,01 Aa | 1,34 Bb | 0,77 Ab | 0,49 Ab |
| Média | 64,77 | 78,03 | 1,95 | 1,65 | 1,08 | 0,91 |
| C.V. (%) | 19,02 | | 9,92 | | 6,40 | |

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste t de Bonferroni ($p \geq 0,05$) e médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$) dentro das variáveis.

C. nobilior apresentou maior AP quando cultivadas em meio MS + PB, embora não diferiu estatisticamente daquelas cultivadas no meio MS na formulação original

(105,67; 94,27 mm, respectivamente) e maior DP quando cultivadas em meio MS + PB (2,44 mm), ambos utilizando o BIT.

As plantas de *C. nobilior* quando cultivadas em biorreator apresentaram aumento tanto no comprimento das folhas quanto do sistema radicular, além de maior altura e diâmetro dos pseudobulbos. Segundo Ekmekçigil et al. (2019), os biorreatores de imersão temporária são uma alternativa que combina os efeitos positivos dos meios líquidos, juntamente com o baixo custo de mão de obra durante o cultivo de plantas. Dessa forma, as plantas quando cultivadas nesse sistema têm maior área de contato com o meio de cultivo, o que pode ter favorecido o crescimento dos órgãos das plantas, pois são imersas periodicamente no meio, o que permite a absorção de nutrientes em toda a superfície do material vegetal (BONILLA et al., 2020). Outras espécies tem apresentado bons resultados quando cultivadas em BIT, dentre elas *Oncidium leucochilum* Batem (SCHEIDT et al., 2009) e *Cattleya walkeriana* Gardner (MOREIRA et al., 2013).

Além disso, durante os ciclos de imersão, o BIT permite a eliminação de gás etileno para o meio externo, favorecendo tanto o crescimento das plantas, quanto a atividade fotossintética (GEORGIEV et al., 2014). Da mesma forma, Muñiz (2018) menciona que neste tipo de sistema de cultivo, a renovação de oxigênio do recipiente faz com que as plantas cultivadas apresentem uma melhor relação entre fotossíntese e transpiração, o que propicia uma maior assimilação dos nutrientes do meio para o crescimento e desenvolvimento de órgãos.

Ainda, a adição de suplementos orgânicos aos meios de cultivo, tais como a polpa de banana, tem favorecido o crescimento de diversas espécies de orquídeas cultivadas *in vitro* como *Dendrobium nobile* Lindl. (SU et al., 2012), *Laeliocattleya* (Gonçalves et al., 2016) e *Cattleya nobilior* Rchb. f. (FREITAS et al., 2021). Os compostos presentes na banana podem deixar o meio de cultivo ainda mais rico em nutrientes, o que pode ajudar a suplementar o teor de vitaminas, aminoácidos e reguladores de crescimento, sendo estes facilmente absorvidos pelas plântulas estabelecidas *in vitro* (DOLCE et al., 2020).

Os resultados desse trabalho permitem inferir que, quando as plantas de *C. nobilior* foram cultivadas em sistema convencional ocorreu o perfilhamento, fazendo com que aumentassem o número de folhas, brotos e raízes em detrimento do tamanho destes. Em contrapartida, quando o cultivo foi realizado em BIT, os órgãos das plantas aumentaram em tamanho (diâmetro e comprimento), como pode ser visualizado na Figura 1. Essas características, observadas em plantas oriundas de biorreator são desejáveis ao cultivo *ex vitro*, principalmente quando o meio de cultivo foi suplementado com PB, pois

as plantas atingiram maior tamanho em menor tempo, o que é positivo para a produção comercial de mudas.

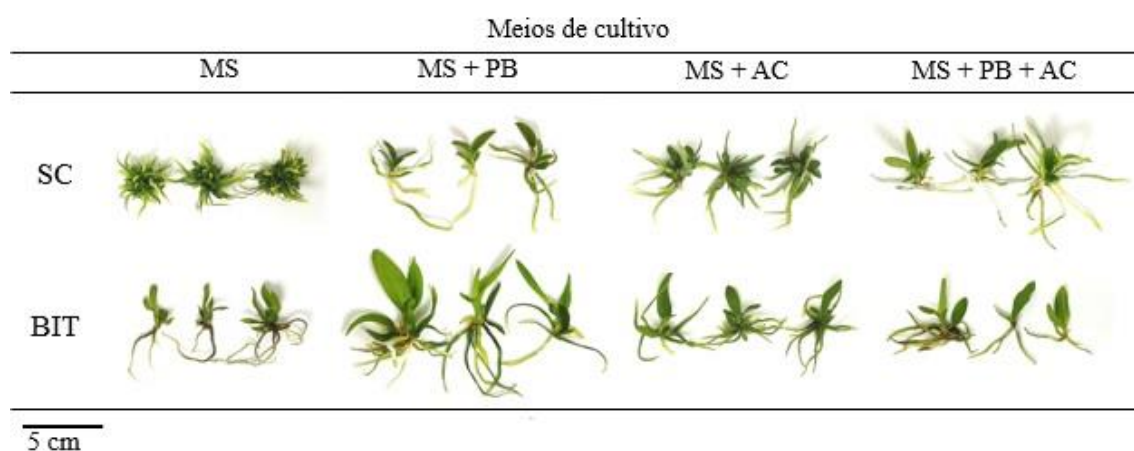


FIGURA 1. Plantas de *Cattleya nobilior* Rchb.f., após 180 dias de cultivo *in vitro* em função de concentrações de banana e água de coco no meio de cultivo e do sistema de micropropagação. SC = sistema convencional; BIT = biorreator de imersão temporária. Dourados – MS, UFGD, 2021.

Crescimento *ex vitro*

Após 180 dias de aclimatização, a análise de variância demonstrou efeito significativo da interação entre os meios de cultivo e os sistemas de micropropagação para todas as características avaliadas no cultivo *ex vitro* de *C. nobilior* (Quadro 5).

QUADRO 5. Resumo da análise de variância da porcentagem de sobrevivência (%SOB), número de folhas (NF), número de raízes (NR), número de brotações (NB), comprimento da maior folha (CF), comprimento da maior raiz (CR), altura de planta (AP), diâmetro do pseudobulbo (DP) e massa fresca (MF) de *Cattleya nobilior* Rchb.f., em função de diferentes meios de cultivo e sistemas de micropropagação após 180 dias de cultivo *ex vitro*. Dourados – MS, UFGD, 2021.

| FV | GL | Quadrado médio | | | | | | | | |
|----------|----|----------------|----------|----------|--------------------|----------|---------|--------------------|---------------------|---------------------|
| | | %SOB | NF | NR | NB | CF | CR | AP | DP | MF |
| S | 1 | 7311,07** | 469,22** | 60,02** | 0,02 ^{ns} | 293,54** | 55,50** | 0,35 ^{ns} | 19,83 ^{ns} | 18,84 ^{ns} |
| M | 3 | 4159,62** | 469,22** | 780,49** | 323,42** | 310,98** | 58,15** | 77,43** | 1460,19** | 459,94** |
| S x M | 3 | 5133,05** | 469,22** | 228,69** | 646,82** | 534,25** | 60,80** | 39,09** | 2143,20** | 399,34** |
| Erro | 32 | 18,90 | 4,28 | 7,07 | 5,50 | 7,61 | 0,42 | 1,22 | 6,07 | 8,03 |
| Média | | 67,07 | 3,42 | 6,52 | 4,92 | 18,53 | 1,25 | 2,32 | 16,18 | 9,94 |
| C.V. (%) | | 3,76 | 12,58 | 14,00 | 13,38 | 7,41 | 7,42 | 13,49 | 6,99 | 11,42 |

** : significativo a 1% de probabilidade; ns: não significativo pelo teste F.

GL.: grau de liberdade. F.V: fator de variação. S: sistemas de micropropagação. M: meio de cultivo.

Ao final do período experimental, verificou-se maior %SOB para as plantas oriundas do cultivo *in vitro* em biorreator de imersão temporária com meio MS + PB e MS + AC com média de 100% de plantas vivas em ambos os meios de cultivo (Figura 2).

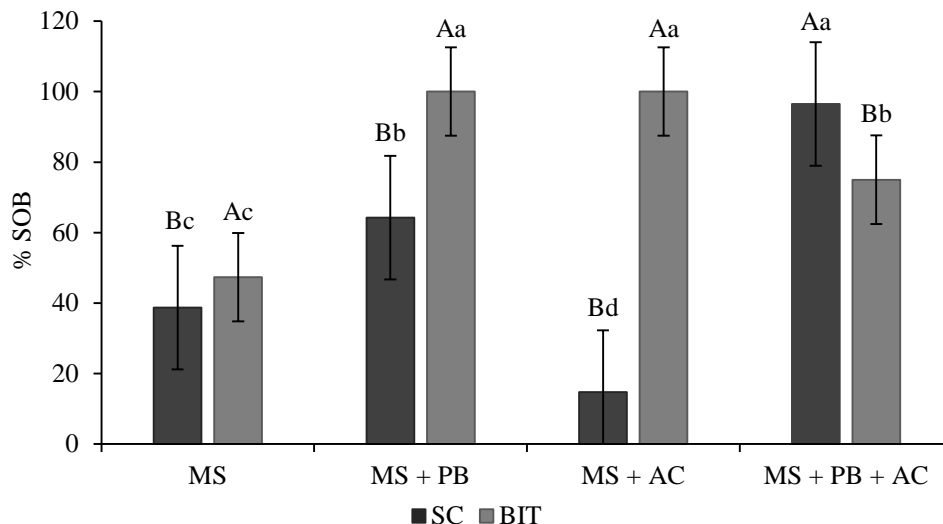


FIGURA 2. Sobrevivência de plantas de *Cattleya nobilior* Rchb.f., após 180 dias de aclimatização em função do meio de cultivo (MS; MS + polpa de banana (PB); MS + água de coco (AC); MS + PB + AC) e do sistema de micropropagação (SC= sistema convencional; BIT= biorreator de imersão temporária). Letras maiúsculas comparam os diferentes sistemas de micropropagação dentro do mesmo meio de cultivo e letras minúsculas comparam o mesmo sistema de micropropagação em meios de cultivo diferentes. Dourados – MS, UFGD, 2021.

No que se refere ao NF e NR a interação S x M demonstrou que os maiores incrementos foram observados em plantas provenientes do cultivo *in vitro* em meio MS + AC (27,40%) e MS (26,60%) respectivamente, ambos utilizando biorreator de imersão temporária. Para NB, foi observado maior incremento nas plantas cultivadas em sistema convencional em conjunto com o meio MS + PB (19,80%) (Quadro 6).

QUADRO 6. Incrementos (%) de número de folhas (NF), número de raízes (NR) e número de brotações (NB) de *Cattleya nobilior* Rchb.f. em função do meio de cultivo (MS; MS + polpa de banana (PB); MS + água de coco (AC); MS + PB + AC) e do sistema de micropropagação (SC= sistema convencional; BIT= biorreator de imersão temporária), após 180 dias de cultivo *ex vitro*. Dourados – MS, UFGD, 2021.

| Meio | NF | | NR | | NB | |
|--------------|---------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | SC | BIT | SC | BIT | SC | BIT |
| MS | 0,00 Aa | 0,00 Ab | 12,40 Ba | 26,60 Aa | 0,00 Ab | 0,00 Ab |
| MS + PB | 0,00 Aa | 0,00 Ab | 0,00 Bb | 4,40 Ab | 19,80 Aa | 0,00 Bb |
| MS + AC | 0,00 Ba | 27,40 Aa | 0,00 Ab | 0,00 Ab | 0,00 Bb | 19,60 Aa |
| MS + PB + AC | 0,00 Aa | 0,00 Ab | 8,80 Aa | 0,00 Bb | 0,00 Ab | 0,00 Ab |
| Média | 0,00 | 6,85 | 5,3 | 7,75 | 4,95 | 4,90 |
| C.V.(%) | 12,58 | | 14,00 | | 13,38 | |

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste t de Bonferroni ($p \geq 0,05$) e médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$) dentro das variáveis.

Quanto ao CF houve maior incremento em plantas oriundas do cultivo *in vitro* em sistema convencional utilizando meio MS na formulação original (33,96%), e para CR naquelas obtidas através do cultivo em biorreator de imersão temporária em conjunto com o meio MS + PB (9,75%) (Quadro 7).

QUADRO 7. Incrementos (%) de comprimento da maior folha (CF) e comprimento da maior raiz (CR) de *Cattleya nobilior* Rchb.f., em função do meio de cultivo (MS; MS + polpa de banana (PB); MS + água de coco (AC); MS + PB + AC) e do sistema de micropropagação (SC= sistema convencional; BIT= biorreator de imersão temporária), após 180 dias de cultivo *ex vitro*. Dourados – MS, UFGD, 2021.

| Meio | CF | | CR | |
|--------------|----------|-----------|---------|---------|
| | SC | BIT | SC | BIT |
| MS | 33,96 Aa | 15,78 Bb | 0,32 Aa | 0,00 Ab |
| MS + PB | 22,49 Ab | 7,90 Bc | 0,00 Ba | 9,75 Aa |
| MS + AC | 14,31 Ac | 11,10 Abc | 0,00 Aa | 0,00 Ab |
| MS + PB + AC | 14,21 Bc | 28,52 Aa | 0,00 Aa | 0,00 Ab |
| Média | 21,24 | 15,82 | 0,08 | 2,43 |
| C.V.(%) | 7,41 | | 7,42 | |

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste t de Bonferroni ($p \geq 0,05$) e médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$) dentro das variáveis.

Por outro lado, na interação S x M foi observado o maior incremento de AP (8,92%) em plantas cultivadas em BIT utilizando-se meio MS + PB. Em relação as demais características, verificou-se que o maior incremento ocorreu em plantas provenientes do

cultivo *in vitro* em sistema convencional em conjunto com o meio MS + PB para a variável DP e meio MS + PB + AC para MF (55,18; 26,57%, respectivamente) (Quadro 8).

QUADRO 8. Incrementos (%) de altura de planta (AP), diâmetro do pseudobulbo (DP) e massa fresca (MF) de *Cattleya nobilior* Rchb.f., em função do meio de cultivo (MS; MS + polpa de banana (PB); MS + água de coco (AC); MS + PB + AC) e do sistema de micropropagação (SC= sistema convencional; BIT= biorreator de imersão temporária), após 180 dias de cultivo *ex vitro*. Dourados – MS, UFGD, 2021.

| Meio | AP | | DP | | MF | |
|--------------|----------|---------|----------|-----------|----------|-----------|
| | SC | BIT | SC | BIT | SC | BIT |
| MS | 4,00 Aa | 0,00 Bb | 0,00 Bc | 18,72 Aab | 3,53 Ac | 1,61 Ac |
| MS + PB | 3,70 Bab | 8,92 Aa | 55,18 Aa | 13,37 Bc | 12,41 Ab | 14,30 Aa |
| MS + AC | 0,00 Ac | 0,00 Ab | 0,00 Bc | 20,19 Aa | 0,00 Bc | 12,51 Aab |
| MS + PB + AC | 1,96 Ab | 0,00 Bb | 6,71 Bb | 15,26 Abc | 26,57 Aa | 8,60 Bb |
| Média | 2,41 | 2,23 | 15,47 | 16,89 | 10,62 | 9,26 |
| C.V.(%) | 13,49 | | 6,99 | | 11,42 | |

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste t de Bonferroni ($p \geq 0,05$) e médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$) dentro das variáveis.

De maneira geral, o estabelecimento *ex vitro* de *C. nobilior* demonstrou que o prévio cultivo em BIT utilizando-se os meios MS + PB ou MS + AC propiciou maior porcentagem de sobrevivência. Porém, a adição de PB também resultou no aumento em tamanho (altura e comprimento de raiz), sendo essas características desejáveis durante a fase de aclimatização. Dessa forma, quando utilizou-se o meio MS + PB em BIT, verificou-se um bom desenvolvimento das plantas culminando com o melhor desempenho no cultivo *ex vitro*.

Este fato pode estar relacionado com o acúmulo de carboidratos presente no meio em que as plantas foram cultivadas *in vitro*, devido à suplementação com polpa de banana. Esses carboidratos são utilizados como fonte de energia para mudas micropropagadas, além disso, exercem um papel fundamental no crescimento e desenvolvimento *in vitro* de plantas e também auxiliam no processo de aclimatização *ex vitro* (BADR et al., 2015). Segundo Su et al. (2012), a banana é um composto orgânico muito utilizado na propagação de *in vitro* de orquídeas e atua como fonte de potássio e estimulador de enraizamento de plantas.

No presente estudo, a suplementação com polpa de banana estimulou o crescimento de mudas, bem como o desenvolvimento do sistema radicular de *C. nobilior*.

Esse efeito pode ter ocorrido devido a sua composição, uma vez que esses extratos possuem seus próprios sais minerais, além de reguladores de crescimento como auxinas, citocininas e giberelinas que são substâncias responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento do vegetal (DOLCE et al., 2020; MACHADO e ZAMARIAN, 2020).

Além disso, o aumento da taxa de crescimento das plantas durante a fase de aclimatização, pode ter ocorrido devido ao sistema de cultivo *in vitro* utilizado, pois os biorreatores de imersão temporária permitem trocas gasosas, o que leva a redução da umidade relativa, aumento da transpiração e absorção de água e nutrientes pelas mudas, além de diminuir o acúmulo de gás etileno e CO₂, o que favorece o crescimento da planta no cultivo *in vitro* e proporciona posterior rusticidade quando transferidas para a fase *ex vitro* (XIAO et al., 2011; SILVA et al., 2016).

Dessa forma, esses resultados corroboram com os de Ribeiro et al. (2019) que estudaram o crescimento de plantas de *Dendrobium bigibbum* Lindl. em diferentes sistemas de vedação *in vitro*, e verificaram que as plantas que vieram previamente do cultivo *in vitro* em sistema que permitiam trocas gasosas, apresentaram maior crescimento durante o processo de aclimatização *ex vitro* em relação as plantas cultivadas sob vedação hermética dos frascos.

Nesse contexto, com os resultados obtidos no estudo pode-se verificar que a utilização de BIT e a suplementação com polpa de banana no meio de cultivo, proporcionaram condições favoráveis no desenvolvimento das plantas de *C. nobilior* durante o cultivo *in vitro* (Figura 1) e *ex vitro* (Figura 3).

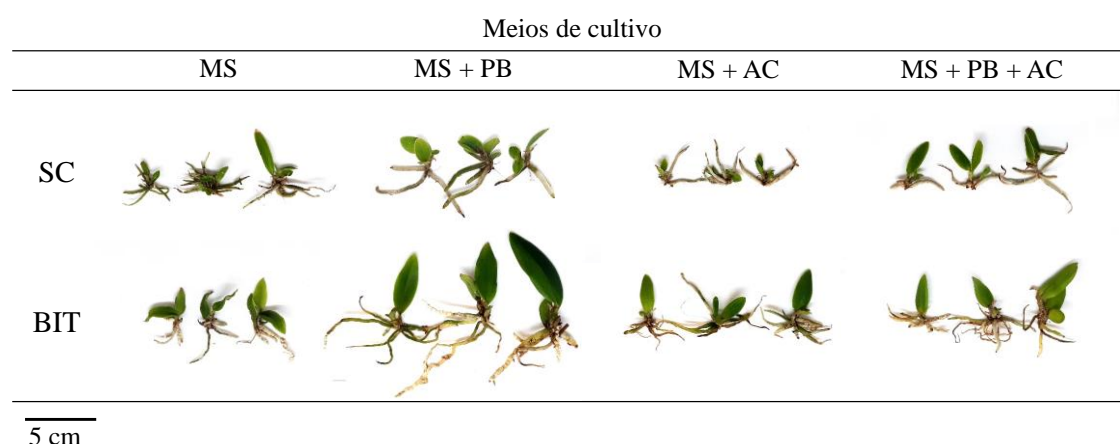


FIGURA 3. Plantas de *Cattleya nobilior* Rcbh.f., após 180 dias de aclimatização em função de concentrações de banana e água de coco no meio de cultivo e do sistema de micropropagação durante o cultivo *in vitro*. SC = sistema convencional; BIT = biorreator de imersão temporária. Dourados – MS, UFGD, 2021.

CONCLUSÃO

Para o crescimento *in vitro* e estabelecimento *ex vitro* de *C. nobilior*, recomenda-se o cultivo *in vitro* em biorreator de imersão temporária, utilizando-se o meio MS suplementado com 100 g L⁻¹ de polpa de banana maçã.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BADR, A.; ANGERS, P.; DESJARDINS, Y. Comprehensive analysis of *in vitro* to *ex vitro* transition of tissue cultured potato plantlets grown with or without sucrose using metabolic profiling technique. **Plant cell, tissue and organ culture (PCTOC)**, v. 122, p. 491-508, 2015.

BALOGUN, M. O.; MAROYA, N.; ASIEDU, R. Status and prospects for improving yam seed systems using temporary immersion bioreactors. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, p. 1614-1622, 2014.

BONILLA, J. O.; GONZÁLEZ, S. R.; MARTÍNEZ, G. L.; MEDINA, I. O. Guarianthe skinneri (Orchidaceae). **IBCIENCIAS**, v. 3, p. 1-6, 2020.

CARDOSO, J. C. Publicação em cultivo *in vitro* de plantas: qualidade para o avanço científico e tecnológico. **Horticultura Brasileira**, v. 32, p. 383-384, 2014.

CHASE, M. W.; CAMERON, K. M.; FREUDENSTEIN, J. V.; PRIDGEON, A. M.; SALAZAR, G.; VAN DEN BERG, C.; SCHUITEMAN, A. An updated classification of Orchidaceae. **Botanical journal of the Linnean Society**, v. 177, p. 151-174, 2015.

CNCFlora. **Cattleya nobilior** in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2. Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em: <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Cattleya nobilior](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Cattleya_nobilior)>. Acesso em: 19 outubro 2020.

DOLCE, N. R.; MEDINA, R. D.; TERADA, G.; GONZÁLEZ-ARNAO, M. T.; FLACHSLAND, E. A. *In Vitro* Propagation and Germplasm Conservation of Wild Orchids from South America. **Orchid Biology: Recent Trends & Challenges**, p. 37-94, 2020.

EKMEKÇİGİL, M.; BAYRAKTAR, M.; AKKUŞ, Ö.; GÜREL, A. High-frequency protocorm-like bodies and shoot regeneration through a combination of thin cell layer and RITA[®] temporary immersion bioreactor in *Cattleya forbesii* Lindl. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 136, p. 451-464, 2019.

FARIA, R. T.; ASSIS, A. M.; CARVALHO, J. F. R. P. **Cultivo de orquídeas**. Londrina: Mecenias, p. 208, 2010.

FARIA, R. T.; ASSIS, A. M.; UNEMOTO, L. K.; CARVALHO, J. F. R. P. **Produção de orquídeas em laboratório**. Londrina: Mecenias, p. 124, 2012.

FLORA DO BRASIL 2020 EM CONSTRUÇÃO. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB179>>. Acesso em: 10 fevereiro 2021.

FREITAS, E. M.; HERRMANN, M. H.; BRUISMA, G.; PÉRICO, E.; DE ARAÚJO, A. G. Propagação *in vitro* de *Cattleya intermedia* graham ex hook. (orchidaceae) em diferentes meios de cultura. **Revista Caderno Pedagógico**, v. 11, p. 30-41, 2014.

FREITAS, K. G.; SORGATO, J. C.; SOARES, J. S.; RIBEIRO, L. M. *In vitro* growth of *Cattleya nobilior* Rchb. f.: culture media, sealing systems and irradiance. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 51, p. e67131-e67131, 2021.

GEORGIEV, V.; SCHUMANN, A.; PAVLOV, A.; BLEY, T. Temporary immersion systems in plant biotechnology. **Engineering in life sciences**, v. 14, p. 607-621, 2014.

GONÇALVES, L. M.; MACHADO, P. S.; DE FÁTIMA, M.; BALLESTA, P.; MORA, F.; MILANEZE GUTIERRE, M. A.; MANGOLIN, C. A. Suplementos orgânicos para el cultivo *in vitro* del híbrido *Laelio cattleya* (Orchidaceae). **Idesia (Arica)**, v. 34, p. 47-54, 2016.

JORGE, J.; ABRÃO, M. C. R.; SUZUKI, R. M. Germinação e crescimento inicial *in vitro* de *Cattleya warneri* T. Moore (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 13, n. 3, 2015.

JUNQUEIRA, A. H.; PEETZ, M. S. Brazilian consumption of flowers and ornamental plants: habits, practices and trends. **Ornamental Horticulture**, v. 23, p. 178-184, 2017.

KNUDSON, L. A new nutrient solution for the germination of orchid seed. **American Orchid Societ Bulletin**, v. 15, p. 214-217, 1946.

LEMES, C. S. R. **Germinação, desenvolvimento e aclimatização de *Miltonia flavescens* Lindl. (Orchidaceae)**. 2015. 55p. Tese de Doutorado em Produção Vegetal - Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados-MS.

MACHADO, W.; ZAMARIAN, A. S. Polpa de Banana, Água de Coco e Carvão Ativado no Desenvolvimento *in vitro* de *Lycaste* sp. **Ensaio e Ciência C Biológicas Agrárias e da Saúde**, v. 24, p. 159-163, 2020.

MARTINS, J. P. R.; VERDOODT, V.; PASQUAL, M.; DE PROFT, M. Impacts of photoautotrophic and photomixotrophic conditions on *in vitro* propagated *Billbergia zebrina* (Bromeliaceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 123, p. 121-132, 2015.

MENGARDA, L. H. G.; COLA, G. P. A.; DE OLIVEIRA, S. C.; DE FREITAS, A. R. Multiplication, rooting *in vitro*, and acclimatization of *Brassavola tuberculata* Hook. (Orchidaceae), an orchid endemic to the brazilian Atlantic Rainforest. **Bioscience Journal**, v. 33, n. 3, 2017.

MOREIRA, A. L.; SILVA, A. B. D.; SANTOS, A.; REIS, C. O. D.; LANDGRAF, P. R. C. *Cattleya walkeriana* growth in different micropropagation systems. **Ciência Rural**, v. 43, p. 1804-1810, 2013.

- MUÑIZ, RAFAEL. La propagación *in vitro* de plantas con Sistemas de Inmersión Temporal. Una Tecnología Apropriada para la agricultura sustentable. **Tekhné**, v. 21, n. 3, 2018.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiology plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- MURTHY, H. N.; PAEK, K. Y.; PARK, S. Y. Micropropagation of orchids by using bioreactor technology. In: Lee, Y. I.; Yeung, E. T. (eds) **Orchid Propagation: From Laboratories to Greenhouses - Methods and Protocols**. Humana Press, New York, NY, p. 195-208, 2018.
- REIS, C. O. D.; SILVA, A. B. D.; LANDGRAF, P. R. C.; BATISTA, J. A., JACOME, G. A. R. Bioreactor in the micropropagation of ornamental pineapple. **Ornamental Horticulture**, v. 24, p. 182-187, 2018.
- RIBEIRO, L. M.; SORGATO, J. C.; SCALON, S. D. P. Q.; SOARES, J. S.; RIBEIRO, I. S. Influência da luz, ventilação natural e tamanho do frasco no crescimento e desenvolvimento de denphal (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias (Agrária)**, v. 14, p. 5957, 2019.
- RIBEIRO, L. M.; SORGATO, J. C.; SOARES, J. S.; RAMOS, J. C. M. Methodology of the tetrazolium test for identifying viable seeds of orchids of the genus *Cattleya* native to the Brazilian Cerrado. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 42, p. 1351-1360, 2021.
- RODRIGUEZ, D. P.; BARROS, F.; DAMASCENO-JUNIOR, G. A.; BORTOLOTTI, I. M. Levantamento da Família Orchidaceae no Morro Santa Cruz, Municípios de Corumbá e Ladário, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Hoehnea**, v. 36, p. 613-636, 2009.
- SCHEIDT, G. N.; DA SILVA, A. L. L.; DRONK, A. G.; BIASI, L. A.; ARAKAKI, A. H.; SOCCOL, C. R. Multiplicação *in vitro* de *Oncidium leucochilum* (Orchidaceae) em diferentes sistemas de cultivo. **Biociências**, v. 17, p. 82-85, 2009.
- SCHNEIDERS, D.; PESCADOR, R.; BOOZ, M. R.; SUZUKI, R. M. Germinação, crescimento e desenvolvimento *in vitro* de orquídeas (*Cattleya* spp., Orchidaceae). **Revista Ceres**, v. 59, p. 185-191, 2012.
- SILVA, A. B.; REIS, C. O.; CAZETTA, J. O.; CARLIN, S. D.; LANDGRAF, P. R. C.; REIS, M. C. Effects of exogenous proline and a natural ventilation system on the *in vitro* growth of orchids. **Bioscience Journal**, v. 32, p. 619- 626, 2016.
- SOARES, J. S.; SORGATO, J. C.; RIBEIRO, L. M. Protocolo para germinação assimiótica e desenvolvimento inicial de protocormos de orquídeas nativas do Cerrado brasileiro. **Rodriguésia**, v. 71, 2020.
- SOUSA, G. G., ROSA, Y. B., MACEDO, M. C., SOARES, J. S. Aclimatização de *Brassavola tuberculata* com a utilização de ANA em diferentes substratos. **Horticultura Brasileira**, v. 33, p. 208-215, 2015.
- SU, M. J.; SCHINITZER, J. A.; FARIA, R. T. Polpa de banana e fertilizantes comerciais no cultivo *in vitro* de orquídea. Científica, v. 40, p. 28-34, 2012.

TEIXEIRA DA SILVA, J. A.; HOSSAIN, M. M.; SHARMA, M.; DOBRÁNSZKI, J.; CARDOSO, J. C.; SONGJUN, Z. Acclimatization of *in vitro*-derived *Dendrobium*. **Horticultural Plant Journal**, v. 3, p. 110-124, 2017.

TEIXEIRA DA SILVA, J. A.; TSAVKELOVA, E. A.; NG, T. B.; PARTHIBHAN, S.; DOBRÁNSZKI, J.; CARDOSO, J. C.; ZENG, S. Asymbiotic *in vitro* seed propagation of *Dendrobium*. **Plant Cell Reports**, v. 34, p. 1685-1706, 2015.

UTAMI, E. S. W.; HARIYANTO, S.; MANUHARA, Y. S. W. *In vitro* propagation of the endangered medicina orchid, *Dendrobium lasianthera* J. J. Sm through mature seed culture. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, p. 406-410, 2017.

VACIN, E. F.; WENT, F. W. Some pH in nutrient solutions. **Botanical Gazette**, v. 110, p. 605-617, 1949.

XIAO, Y.; NIU, G.; KOZAI, T. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 105, p. 149-158, 2011.